

**Untersuchungen zur Rolle des Endozytoserezeptors Megalin in
der zellulären Aufnahme von Steroidcarrierproteinen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin



von

Diplom-Biologin Regina Burmeister

Geboren am 11. November 1971 in Pinneberg

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Michael Linscheid

Gutachter: 1. Prof. Dr. Thomas Willnow

2. Prof. Dr. Wolfgang Lockau

3. Dr. habil. Michael Bader

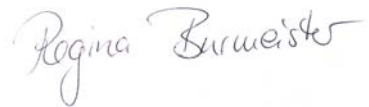
Tag der mündlichen Prüfung: 27. Februar 2003

Erklärung

Diese Arbeit wurde in der Zeit vom 02.01.1999 bis zum 30.09.2002 in der Arbeitsgruppe Molekulare Herz-Kreislauf-Forschung von Prof. Dr. Thomas Willnow am Max – Delbrück - Centrum für Molekulare Medizin (MDC) in Berlin - Buch angefertigt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und verfasst habe. Es fanden ausschließlich die angegebene Hilfsmittel Verwendung. Literaturquellen sind als solche kenntlich gemacht.

Berlin, 08.10.2002

A handwritten signature in cursive script, reading "Regina Burmeister". The ink is dark and the signature is fluid, with a long horizontal stroke at the end.

INHALTSVERZEICHNIS

DANKSAGUNG	VII
ABKÜRZUNGEN	VIII
1. EINLEITUNG	6
1.1. Die Struktur der LDL Rezeptor Gen Familie	6
1.2. Die Vertreter der LDL Rezeptor Gen Familie bei Säugetieren	9
1.2.1. LDL R	9
1.2.2. VLDL R	10
1.2.3. Apo E R II	12
1.2.4. MEGF 7	12
1.2.5. LRP	13
1.2.6. LRP1B	13
1.2.7. LRP 5 und LRP 6	14
1.2.8. Megalin	14
1.3. Lipocaline	22
1.3.1. Apolipoprotein D (Apo D)	24
1.3.2. 24p3 / Uterocalin	26
1.4. CCSP	27
2. ZIELSETZUNG	29
3. MATERIAL UND METHODEN	30
3.1. Antikörper	30
3.2. Verwendete Tiere und Organismen	30
3.2.1. Mäusehaltung	30
3.2.2. Bakterien	31
3.3. SDS-PAGE und Western Blot Analysen	31
3.3.1. Coomassiefärbung	31
3.3.2. Silberfärbung	31
3.3.3. Western Blot Analysen	32
3.4. Immunhistologie	32
3.4.1. Gefrierschnitte	32
3.4.2. Parafinschnitte	33

3.4.3.	Mikroskopie	33
3.5.	Urinproben	33
3.6.	Lungen - Lavage	34
3.7.	Synchronisierung des Zyklus	34
3.8.	Uterine luminale Flüssigkeit (ULF)	35
3.8.1.	Gewinnung	35
3.8.2.	Aufreinigung des Megalin - bindenden Bestandteils in der ULF	35
3.9.	Klonierung der Konstrukte ApoD und 24p3	36
3.9.1.	Primer	36
3.9.2.	Amplifikation durch PCR	36
3.9.3.	Ligation in den pGEM - T [®] Easy I - Vektor	37
3.9.4.	Transformation in Kalzium - kompetente E.coli Bakterien	37
3.9.5.	DNA-Isolierung	37
3.9.6.	Umklonierung in den Zielvektor pCEP-Pu-SP-his-myc-fX	38
3.10.	Zellkultur	39
3.10.1.	Generelle Zellkulturbedingungen	39
3.10.2.	Herstellung eines Membranextraktes aus Dottersackzellen (BN16)	40
3.11.	Aufreinigung und Darstellung der Proteine	41
3.11.1.	RAP	41
3.11.2.	CCSP	42
3.11.3.	ApoD und 24p3	42
3.12.	¹²⁵ Jod – Markierung der Proteine	42
3.13.	in vitro Aufnahme - und Degradationsstudien	43
3.13.1.	Degradationsassay	43
3.13.2.	Steroid - Bindung	43
3.14.	BIAcore Analysen	44
3.15.	Quantifizierung von RNA - Expression durch TaqMan [®] PCR	44
3.15.1.	RNA - Präparation	44
3.15.2.	Synthese von cDNA	45
3.15.3.	Primer und TaqMan [®] Probes	46

3.15.4. TaqMan® PCR	46
4. ERGEBNISSE	48
4.1. Allgemeines	48
4.2. 24p3	50
4.2.1. Aufreinigung von 24p3	50
4.2.2. Immunisierung	53
4.2.3. BIAcore Analyse der 24p3 - Bindung an Megalin	54
4.3. Apo D	56
4.3.1. Aufreinigung von Apo D	56
4.3.2. Immunisierung	59
4.3.3. BIAcore Analyse der Apo D - Bindung an vier LDL R Familienmitglieder	60
4.3.4. Apo D - Aufnahme und Degradation durch BN 16 Zellen	62
4.3.5. Apo D - Progesteron	65
4.4. CCSP BIAcore Analysen	67
4.4.1. CCSP - Bindung an Cubilin und Megalin	67
4.4.2. Bindungsaffinität von CCSP an Cubilin	68
4.4.3. CCSP Bindung an Cubilin in Abhängigkeit von Kalzium und Magnesium	69
4.4.4. Inhibierung der CCSP Bindung zu Cubilin durch RAP	70
4.5. CCSP in vitro	72
4.5.1. BN 16 Zellen als Zellmodell	72
4.5.2. CCSP - Aufnahme und Degradation durch BN 16 Zellen	73
4.5.3. Inhibierung der CCSP Aufnahme durch Antikörpern	74
4.6. CCSP in vivo	76
4.6.1. CCSP im Urin von Patienten mit einer Cubilin Defizienz	76
4.6.2. CCSP im Urin Megalin defizienter Mäuse	78
4.6.3. CCSP Lokalisation in der Niere	79
4.6.4. Cubilin in der Niere	80
4.6.5. CCSP in der Lunge	82
4.6.5.1. Gesamtproteinbild bei Megalin defizienten Tieren und Kontrollen	83

4.6.5.2.	<i>CCSP-Quantifizierung in der Lavage von Megalin</i>	
	<i>Knockout und Kontrolltieren</i>	83
4.7.	<i>Expression von Megalin im Uterus</i>	85
4.7.1.	<i>Megalin Expressionsmuster während der postnatalen</i>	
	<i>Entwicklung</i>	86
4.7.2.	<i>Megalin Expression in Abhängigkeit des Zyklus</i>	89
4.8.	<i>Liganden für Megalin in der uterinen, luminalen Flüssigkeit</i>	
	<i>(ULF)</i>	98
4.8.1.	<i>Proteinmuster von ULF im Zyklus</i>	99
4.8.2.	<i>Proteinmuster von ULF im Zyklus von Megalin defizienten</i>	
	<i>Mäusen</i>	100
4.8.3.	<i>Aufreinigung und Identifizierung des Megalin bindenden</i>	
	<i>Proteins</i>	102
4.9.	<i>Laktoferrin</i>	104
4.9.1.	<i>Expression im Zyklus</i>	104
4.9.2.	<i>Funktion von Laktoferrin im Uterus</i>	105
5.	<i>DISKUSSION</i>	108
5.1.	<i>Megalin im Uterus</i>	109
5.2.	<i>Apo D</i>	116
5.3.	<i>CCSP</i>	118
6.	<i>ZUSAMMENFASSUNG</i>	125
7.	<i>LITERATUR</i>	127

DANKSAGUNG

Prof. Dr. Thomas E. Willnow danke ich herzlichst für die Überlassung des Themas, sowie die hervorragende Anleitung und die unermüdliche Unterstützung meiner Arbeit.

Einen speziellen Dank an Prof. Dr. Wolfgang Lockau von der Humboldt Universität zu Berlin für die offizielle Betreuung meiner Arbeit.

Ein großes Dankeschön an Dr. Christian Jacobsen (Department of Medical Biochemistry, University of Aarhus, Aarhus, Denmark). Die BIAcore Analysen wurden in Zusammenarbeit mit ihm durchgeführt. Bei der Aufreinigung von Laktoferrin half mir Dr. Thomas Andreassen (Department of Medical Biochemistry, University of Aarhus). Prof. Dr. Erik Christensen (Department of Cell Biology, University of Aarhus) danke ich für seine Unterstützung bei den Fluoreszenz- und EM-Aufnahmen. Dr. Anders Nykjaer (Department of Medical Biochemistry, University of Aarhus), der die Zusammenarbeit mit den Wissenschaftlern in Aarhus vermittelte, danke ich im Besonderen.

Die Taqman PCR wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Maren Wellner (Franz-Volhard-Herz-Kreislauf-Klinik, Charité der Humboldt-Universität zu Berlin) durchgeführt. Ich danke ihr für die unkomplizierte Einführung und ihre Mühe.

Unseren technischen Assistenten Charlotte Räder, Hannelore Schulz, Donat Vetter und Marc Eigen danke ich für ihre kompetente und vor allem tatkräftige Unterstützung meiner Arbeit.

Meinen Kollegen Robert Spoelgen, Dr. Helle H. Petersen, Dr. Olav M. Andersen, Dr. Annette Hammes und Juliane Reiche danke ich für die sehr nette Zusammenarbeit. Ich danke Dr. Jörg Leheste, der mich überredete, nach Berlin zu kommen.

Ein super dickes Dankeschön an meine Familie in Hamburg für den Rückhalt, den sie mir gibt.

Nicht nur, aber auch für das kritische Lesen dieser Arbeit danke ich Dr. Christian Bönsch, der mich in jeder erdenklichen Weise unterstützt und der mir mehr als nur ein Partner ist.

ABKÜRZUNGEN

Alle hier aufgelisteten Abkürzungen sind im Text bei ihrem Erstgebrauch erklärt. Die den gängigen, englischen Fachausdrücken angepassten Abkürzungen sind so wiedergegeben, dass die Buchstabenzusammenstellung verständlich bleibt.

α_2 -M	α_2 -Makroglobulin
Apo D, E	Apolipoprotein D, E
Apo E R 2	Apolipoprotein E Rezeptor 2
β_2 M	β_2 Mikroglobulin
BS	Bürstensaum
BSA	bovine serum albumin
CCSP	Clara cell secretory protein
CHO	chinese hamster ovary
CR	complement type repeat
CSF	cerebrospinale Flüssigkeit
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DBP	Vitamin D bindendes Protein
DEPC	Diethyl-pyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTT	Dithiothreitol
E	Endosomen
E. coli	Escherichia coli
ECL	enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
FCS	fetal calf serum
FSH	Follikel stimulierendes Hormon oder Folitropin
GST	Glutathion S - Transferase
GST – RAP	Glutathion S - Transferase – RAP Fusionsprotein
gp	Glykopeptid
GST	Glutathion S-Transferase
HDL	high density lipoprotein
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonat
IDL	intermediate density lipoprotein
IF	intrinsic factor
Ig	Immunglobulin
JIP-1/-2	JNK-interagierende Proteine 1 und 2
JNK	c-jun aminoterminal Kinase
kDa	kilo Dalton

KM	konditioniertes Medium
LDL	low density lipoprotein
LDL R	low density lipoprotein receptor
LH	luteinisierendes Hormon oder Lutropin
LRP	LDL-receptor related protein
MAPK	Mitogen - aktivierte Proteinkinase
MALDI-MS	matrix-assisted laser desorption / ionization mass spectrometry
Mcol	murine Collagenase-like A and B
mDab	mammalian disabled - 1
MMP1	Matrix - Metalloproteinase 1
NB	Medium nach Bindung auf die Säule
NGAL	neutrophile Gelatinase assoziiertes Lipocalin
n x	nfach konzentriert
PBS	phosphatgepufferte Saline
PCB	polychlorierte Biphenyle
PCR	Polymerase chain reaction
PNS	peripheres Nervensystem
PTB	Phosphotyrosin bindende Domäne
RAP	Rezeptor - assoziiertes Protein
RBP	Vitamin A / Retinol bindendes Protein
SCR	structurally and sequence conserved region
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SHH	sonic hedgehog
TC	Transcobalamin
TCA	Trichloressigsäure
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
ULF	uterine luminal fluid
v/v	Volumenprozent (volume per volume)
w/v	Gewichtsprozent (weight per volume)
PAGE	Polyacrylamid – Gel Elektrophorese
PCB	Polychlorinierte Biphenyle
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
VLDL R	very low density lipoprotein receptor
W	Waschfraktion
YWTD	Tyrosin – Tryptophan – Threonin - Asparaginsäure – Tetrapeptid
ZNS	zentrales Nervensystem

1. EINLEITUNG

1.1. Die Struktur der LDL Rezeptor Gen Familie

Die low density lipoprotein (LDL) Rezeptor (LDL R) Gen Familie besteht aus einer Gruppe hoch konservierter Zelloberflächenrezeptoren, die außer in Säugetieren und Vögeln auch in niederen Organismen wie *Caenorhabditis elegans* oder *Drosophila melanogaster* gefunden werden (besprochen von Willnow, 1999).

In Säugetieren wurden bisher neun Vertreter der LDL R Gen Familie beschrieben: der LDL R, der α_2 -Makroglobulin Rezeptor/low density lipoprotein receptor-related protein, hier kurz LRP genannt, LRP 1 B, der very low density lipoprotein (VLDL) Rezeptor (VLDL R), gp 330/Megalin, hier nur Megalin genannt, der Apolipoprotein E Rezeptor II (Apo E R II) und erst kürzlich das multiple EGF (epidermal growth factor)-repeat-containing protein 7 (MEGF 7), sowie LRP 7 (LR 3)/LRP 5, hier LRP 5 genannt und LRP 6.

Aufgrund der bekannten Rolle des LDL R im Cholesterin Metabolismus (Brown and Goldstein, 1986) wurde von den restlichen Familienmitgliedern lange Zeit angenommen, dass auch sie für die Bindung und Aufnahme von Lipoproteinen verantwortlich wären. Heute weiß man, dass diese Rezeptoren in einer ganzen Reihe von zellulären Prozessen eine wichtige Rolle spielen. Sie agieren unter anderem als Signalüberträger bei der Migration von Neuronen (Trommsdorff et al., 1999) oder kontrollieren die Vitamin D₃- und Vitamin A-Homeostase (Nykjaer et al., 1999, Christensen et al., 1999 a und b).

Bisher sind zahlreiche Liganden für LRP, VLDL R und Megalin beschrieben worden, darunter Lipasen, Lipoproteine, Protease-Inhibitoren und Vitamine (Willnow et al., 1992, Christensen et al., 1999, Nykjaer et al., 1994). Des weiteren haben Knockout Maus Modelle gezeigt, dass die Rezeptoren der LDL R Gen Familie lebenswichtige Funktionen einnehmen. Megalin defiziente Tiere entwickeln z. B. schwere Missbildungen des Vorderhirns (Willnow et al., 1996a). Bei VLDL R/Apo E R II Doppelknockout Mäusen kommt es zu keiner zielgerichteten Wanderung der Neuronen, das Cerebellum ist verkleinert und wenig gefurcht, die Schichtung im Cortex umgekehrt (Trommsdorff et al., 1999).

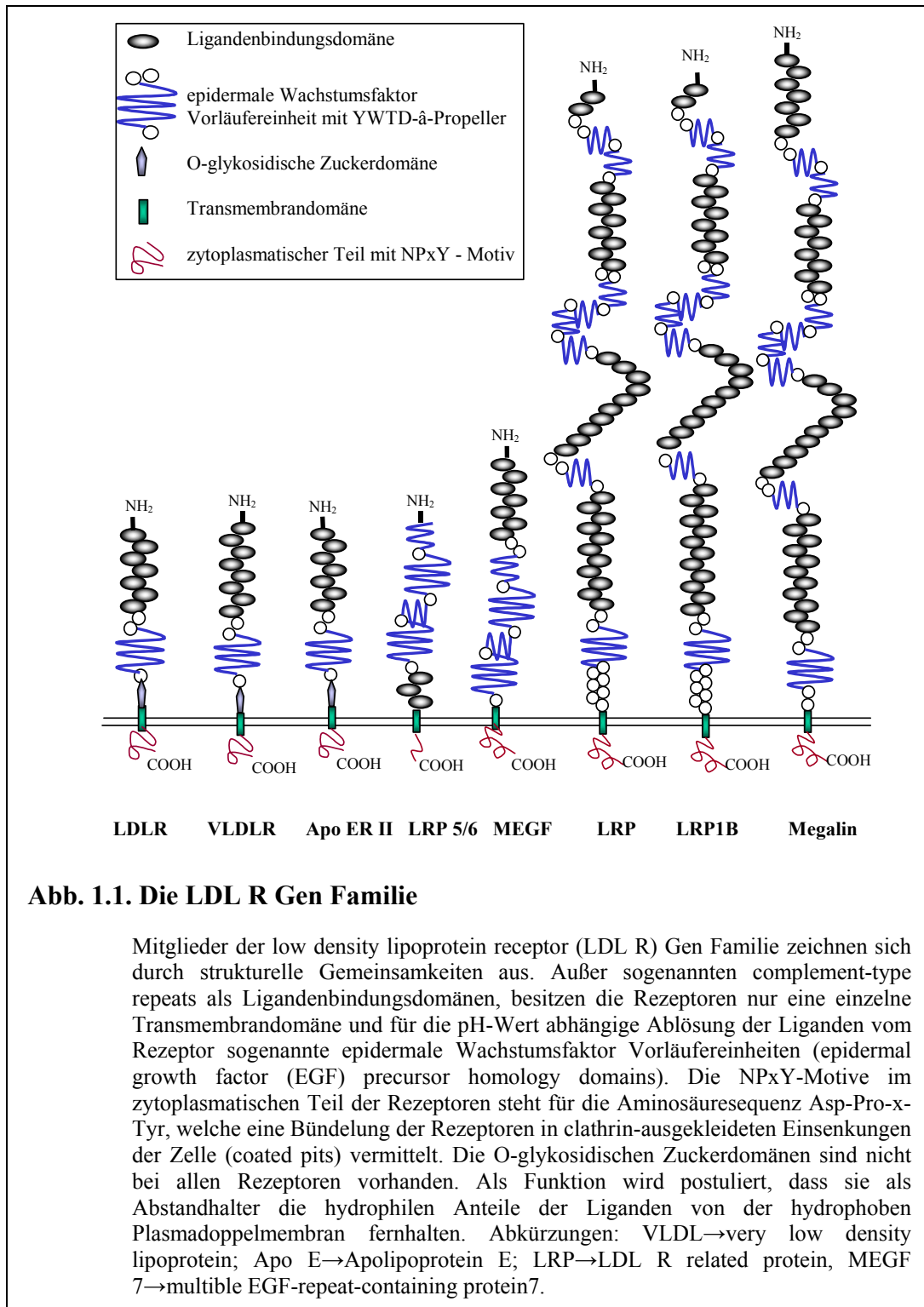


Abbildung 1.1. zeigt vier Strukturmerkmale, die den Mitgliedern der LDL R Gen Familie gemeinsam sind und die ich an dieser Stelle kurz erläutern möchte.

Die cysteinreichen Ligandenbindungsdomänen, auch complement-type repeats (CR) genannt, erhielten ihren Namen, da sie ursprünglich in Faktoren des

Komplementsystems beschrieben worden sind (Marazziti et al., 1988). Sie sind notwendig, um Liganden zu binden. Sechs Cysteinreste bilden drei Disulfidbrücken nach dem Muster C1-C3, C2-C5, C4-C6 aus (Bieri et al., 1995 a und b, Daly et al., 1995 a und b, Fass et al., 1997), zu deren korrekter Ausbildung der Disulfidbrücken Ca^{2+} nötig ist (Atkins et al., 1998). In Abwesenheit von Kalzium kommt es nicht zur Bindung von Liganden (Atkins et al., 1998, Bieri et al., 1998, Dolmer et al., 1998, North and Blacklow, 1999, 2000).

Ligandenbindungsdomänen weisen zwei durch eine α -Helix getrennte Schleifenstrukturen auf, deren erste zwei β -Faltblätter enthält, während die zweite die Bindungsstelle für Kalzium darstellt.

Ein weiteres gemeinsames Strukturmerkmal sind die epidermalen Wachstumsfaktor-Vorläufereinheiten (epidermal growth factor (EGF)-like precursor repeats), die sowohl für die Bindung von Liganden notwendig sind, als auch für eine vom pH-Wert abhängige Ablösung der gebundenen Liganden vom Rezeptor in den Endosomen (Davis et al., 1987). Rekombinante LDL R Varianten, ohne epidermalen Wachstumsfaktor-Vorläufereinheiten können Liganden in die Zelle aufnehmen, dissoziieren jedoch nicht in den Endosomen vom Liganden (Davis et al., 1987, Van der Westhuyzen zeigte 1991). Eine epidermale Wachstumsfaktor-Vorläufereinheit setzt sich aus drei EGF-artigen Einheiten zusammen, wobei eine YWTD (Tyr-Trp-Thr-Asp) - wiederholende Region die ersten beiden von der dritten Einheit abtrennt. Jede EGF-artige Einheit besitzt sechs konservierte Cysteine, die drei Disulfidbrücken (C1-C3, C2-C4, C5-C6) ausbilden (Campbell, et al., 1993). Die mittlere EGF-artige Einheit besitzt ein Kalziumbindungsmotiv (Rees et al., 1988, Handfort et al., 1991). Die zwischen der zweiten und dritten EGF-artigen Einheit liegende YWTD-wiederholende Region, formt einen sechsblättrigen β -Propeller (Springer, 1998), dessen Funktion bisher unbekannt ist. Familiäre Hypercholesterinämie (FH), die sich durch reduzierte Lipoproteinaufnahme auszeichnet, wird jedoch genauso häufig auf Mutationen im Bereich der YWTD - wiederholenden Region wie im Bereich der CR zurückgeführt (Hobbs et al, 1992, Hobbs et al, 1990, Soutar, 1992).

Lediglich LDL R, VLDL R und Apo E R II besitzen eine O-glykosidische Zuckerdomäne, die der Transmembrandomäne im extrazellulären Bereich folgt.

Es wird angenommen, dass aufgrund der umfangreichen Glykosilierung in diesem Bereich (Davis et al., 1986, Iijima et al., 1998) erreicht wird, den Rezeptor fern von der Zelloberfläche zu halten (Jentoft, 1990).

Jedoch allen Rezeptoren ist eine Transmembrandomäne gemein. Zudem besitzen außer LRP5 und LRP6 alle Rezeptoren einen zytoplasmatischen Teil, der mindestens ein NPxY-Motiv enthält, das zur Sammlung der Rezeptoren an clathrinbedeckten, zellulären Einsenkungen (coated pits) vonnöten ist (Chen et al., 1990, Bansal und Gierasch, 1991). LRP5 und LRP6 besitzen YXXL-Motive, so dass auch sie in clathrinbedeckten, zellulären Einsenkungen gesammelt und dann internalisiert werden können (Brown et al., 1998). Doch der zytoplasmatische Teil hat weitere Aufgaben. VLDL R und Apo E R II spielen eine essentielle Rolle in der Signalweiterleitung im sich entwickelnden Gehirn (Trommsdorff et al., 1999). Für die Signalübertragung muss das zytosolische Adaptorprotein mammalian disabled-1 (mDab) am zytoplasmatischen Teil der Rezeptoren binden. MDab besitzt eine Phosphotyrosin bindende (PTB) Domäne, die am Tyrosin im NPxY-Motiv bindet. Megalin besitzt in seinem zytoplasmatischen Teil Erkennungsstellen für die Proteinkinase C, Caseinkinase II und eine cAMP/cGMP-abhängige Kinase (Hjältn et al., 1996).

1.2. Die Vertreter der LDL Rezeptor Gen Familie bei Säugetieren

Um die vielförmigen physiologischen Aufgaben der unterschiedlichen Mitglieder der LDL R Gen Familie verstehen zu können und so einen Einblick zu erhalten, in wie vielen Bereichen die Rezeptoren Einfluss nehmen, gebe ich hier eine kurze Übersicht über alle Vertreter der LDL R Gen Familie. Auf Megalin, den Rezeptor meines Interesses, werde ich ausführlich eingehen.

1.2.1. LDL R

LDL R ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 160 kDa (Südhof et al., 1985 a und b). Der Rezeptor wird hauptsächlich in der Leber produziert, ferner in erheblichen Mengen in den Nebennieren. LDL R findet man außerdem im Gehirn, im Herzen, Darm, Niere, in den Muskeln, in der Gebärmutter, in den Ovarien, im Pankreas, in den Hoden und in der Lunge (Jokinen et al., 1994, Kim et al., 1996, Webb et al., 1994).

Der LDL R bindet Apolipoproteine B (ApoB) und ApoE (Goldstein et al., 1985). Die zelluläre Aufnahme von LDL Partikeln durch den LDL R reguliert die Menge an zirkulierendem Cholesterin (Brown and Goldstein, 1986).

LDL R Knockout Mäuse (Ishibashi et al., 1993) sind lebensfähig und fertil. In ihrem Blut findet sich eine erhöhte Menge an Gesamtcholesterin, das auf gesteigerte IDL-(intermediate density lipoprotein) und LDL-(low density lipoprotein) Werte zurückzuführen ist.

Defekte des LDL R verursachen die familiäre Hypercholesterinämie (FH), die sich durch eine reduzierte Lipoproteinaufnahme auszeichnet. Ein defekter LDL R kann mehrere Ursachen haben. Mutationen im Bereich der Ligandenbindungsdomänen können zu Defekten in der Kalziumbindung, der Disulfidbindungen führen oder das Gesamtgerüst aus Wasserstoffbrücken kann gestört sein. Als Folge kommt es zu keiner Bindung von LDL Partikeln (Blacklow et al., 1996, Fass et al., 1997). Auch Mutationen im zytoplasmatische Teil des LDL R führen zu FH (Brown und Goldstein 1986). Eine Splice-Variante des LDL R, der die O-glykosidische Zuckerdomäne fehlt, führt zu einer milden Form der FH (Kajinami et al., 1988, Koivisto et al., 1993).

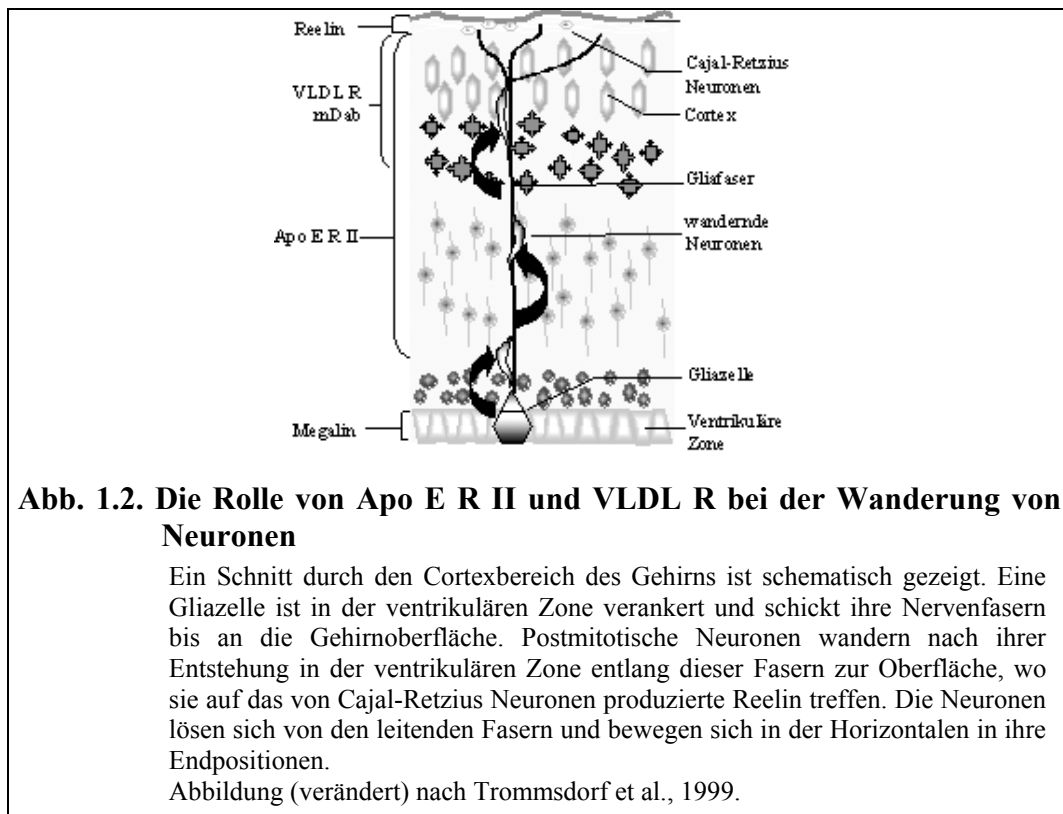
1.2.2. VLDL R

Der VLDL R ist mit nur einer CR-Domäne mehr dem LDL R in der Struktur zwar sehr ähnlich (Oka et al., 1994, Sakai et al., 1994), doch wird der VLDL R anders als der LDL R nicht in der Leber (Nakamura et al., 1998) vorgefunden. Seine Hauptexpression findet im Herzen, im Muskel, im Fettgewebe und in den Ovarien statt. Etwas geringere Mengen findet man im Gehirn und in den Hoden. Auch in der Niere, in den Nebennieren, in der Lunge, Gebärmutter, Bauchspeicheldrüse und Milz wird VLDL R gefunden, allerdings mit niedriger Expression. Es sind einige natürliche Varianten des Rezeptors beschrieben worden, unter anderem solche, denen entweder die dritte CR-Domäne fehlt (Martensen et al., 1997) oder die über keine O-glykosidische Zuckerdomäne verfügen (Christie et al., 1996).

Der VLDL R bindet Lipoproteine, die Apo E enthalten und sichert so den Bedarf bestimmter Gewebe wie Herz und Muskeln an Fettsäuren (Sakai et al., 1994, Takahashi et al., 1992, Webb et al., 1994).

Die VLDL R Knockout Maus (Frykman et al., 1995) ist überlebensfähig und fertil. Mutationen im VLDL R-Homolog beim Huhn hingegen ergeben weibliche Sterilität und Artherosklerose (Bujo et al., 1995).

Mit Apo E R II als Co-Rezeptor spielt der VLDL R bei der Lenkung von neugebildeten postmitotischen Neuronen, die von ihrer Geburtsstätte in der ventrikulären Zone entlang von Leitfasern zu ihrem Bestimmungsort wandern, eine Rolle (Abb. 1.2.).



Reelin, ein Signalpeptid, das von den Cajal-Retzius Neuronen produziert wird, lenkt die Neuronen wie eine Art Wegweiser, bis eine korrekte Schichtung der unterschiedlichen Zellarten erreicht ist. Reelin bindet direkt an VLDL R und Apo E R II, was eine Tyrosin - Phosphorylierung des Adaptermoleküls Dab1 zur Folge hat, das am NPxY-Motiv des zytoplasmatischen Anhangs von VLDLR oder Apo E R II bindet (Hiesberger et al., 1999). In der VLDL R / Apo ER II Doppel-Knockout Maus kommt es zu keiner zielgerichteten Wanderung der Neuronen, die cortikale Schichtung ist verkehrt und es ist im verkleinerten Cerebellum kaum eine Furchung erkennbar. Dieser Phänotyp entspricht dem der sogenannten Reeler-Maus, die nicht in der Lage ist, das Signalpeptid Reelin selbst zu bilden. In

Mäusen, die nur VLDL R defizient sind, berühren die Fehlbildungen hauptsächlich das Cerebellum (Trommsdorf et al., 1999).

1.2.3. Apo E R II

Apo E R II ähnelt dem LDL R, wobei nur humanes Apo E R II sieben CR-Domänen (Kim et al, 1996) hat, beim Huhn und der Maus finden sich acht CR-Domänen (Novak et al., 1996). Sie stellen unterschiedliche Splice-Varianten des gleichen Gens dar (Brandes et al., 1997, 2001, Kim et al., 1997, Korschineck et al., 2001). Exprimiert wird Apo E R II vor allem im Gehirn, ferner im Nebenhoden, in den Eierstöcken und in menschlichen Blutkörpern (Kim et al., 1996, 1997, Riddell et al., 1999, Stockinger et al., 2000). Die männliche Apo E R II Knockout Maus ist nur eingeschränkt zeugungsfähig (Trommsdorff et al., 1999), beide Geschlechter haben eine leichte Veränderung in der Entwicklung des Cortexbereiches im Gehirn. Wie schon bei der Besprechung des VLDL R angedeutet, ist auch Apo E R II ein Rezeptor für Reelin. Deutlich ausgeprägt bei der Apo E R II/VLDL R Doppelknockout Maus sind die schweren Anomalien in der Schichtung des Großhirns und ein fast rudimentäres Cerebellum. Apo E R II bindet außer Reelin noch Apo E, VLDL und β -VLDL-Partikel ((Kim et al., 1996, Novak et al., 1996, Brown and Goldstein, 1986, Herz et al., 1991). Der zytoplasmatische Teil von Apo E R II bindet die c-jun aminoterminal Kinase (JNK) interagierenden Proteine 1 und 2 (JIP-1 und JIP-2). Diese Proteine binden im Übrigen nicht an den intrazellulären Teil des VLDL R (Stockinger et al., 2000), was die etwas unterschiedlichen Phänotypen der beiden Einzelknockout Mäuse von Apo E R II und VLDL R erklären könnte.

1.2.4. MEGF 7

MEGF7 ist das jüngste Mitglied der LDL R Gen Familie und noch relativ unerforscht. Es wurde bei einer Suche nach Proteinen im humanen Gehirn gefunden, die ein hohes Molekulargewicht und zahlreiche EGF-artige Einheiten besitzen (Nakayama et al., 1998). MEGF7 besitzt eine Gruppe von 7 CR-Domänen. Seine Zugehörigkeit zur Familie verdankt MEGF7 der partiell hohen Ähnlichkeit seiner EGF-artigen Einheiten mit denen von LRP und Megalin.

1.2.5. LRP

LRP ist mit einem Molekulargewicht von zirka 600 kDa ein ungewöhnlich großes Protein (Van Leuven et al., 1994). Das gereifte Protein ist glykosiliert und Furin spaltet es in zwei Ketten (Herz et al., 1990, Willnow et al., 1996b). LRP setzt sich dann aus einer aminoterminalen, 515 kDa α -Kette und einer carboxyterminalen, 85 kDa β -Kette zusammen, die in einer nicht-kovalenten Art miteinander verbunden sind (Springer et al., 1998). LRP verfügt nicht über eine O-glykosidische Zuckerdomäne. LRP wird in sehr vielen Organen vorgefunden (Darm, Niere, Nebenniere, Gebärmutter, Eierstöcke, Hoden, Milz und Thymusdrüse), mit höchster Expression allerdings in Leber, Herz und Lunge (Herz et al., 1988). Anders als LDL R wird LRP nur von bestimmten Zelltypen exprimiert, so in Fibroblasten, den Hepatozyten und Kupffer Zellen der Leber, den Hofbauer Zellen der Placenta, den Astrozyten und Neuronen im Cerebellum, sowie in glatten Muskelzellen (Moesrup et al., 1992). LRP Knockout Mäuse sind embryonal letal, homozygote Tiere sterben etwa am Tag 13, 5 p.c. (Herz et al., 1992). An gewebsspezifischen LRP Knockout Mäusen (Rohlmann et al., 1996) wurde untersucht, welche Auswirkungen ein Fehlen des Rezeptor im ausgewählten Organ bewirkt. So konnte gezeigt werden, dass sich in der Zirkulation von Mäusen, die in der Leber kein LRP ausbildeten, Cholesterinreiche Restlipoproteine ansammelten (Rohlmann et al., 1998). Neben dieser Funktion, die sich LRP mit LDL R teilt, bindet LRP zahlreiche weitere Liganden, wie z. B. Apo E-haltige Lipoproteine und α_2 -Macroglobulin/Proteinase-Komplexe, Matrixproteine, viele Proteasen und Proteasen/Inhibitor-Komplexe, sowie Pseudomonas Endotoxin A (Überblicke von Gliemann, 1998 und Neels et al., 1998).

1.2.6. LRP1B

LRP1B besitzt mit 32 CR-Einheiten eine mehr als LRP (Liu et al., 2000b). Die mRNA von LRP1B wurde in der Niere, im Gehirn, in der Lunge, Herz, Blase, Leber, im Skelettmuskel, in den Speicheldrüsen und der Schilddrüse nachgewiesen (Liu et al., 2001, Liu et al., 2000a). Für LRP1B wird angenommen, dass es in der Zellproliferation/Metastasenbildung eine Rolle spielt und als

Tumorsuppressor fungiert (Liu et al., 2000b). Das Gen für LRP1B ist in der Hälfte aller bekannten „non-small-cell“ Lungenkrebs Zelllinien verändert (Liu et al., 2000a).

1.2.7. LRP 5 und LRP 6

LRP5 und LRP6 sind jeweils zirka 180 kDa groß (Hey et al., 1998), beide Rezeptoren vermissen eine O-glykosidische Zuckerdomäne. Sie besitzen statt den klassischen NPxY-Motiven YXXL-Motive im zytoplasmatischen Teil für die Internalisierung durch clathrinbedeckte, zelluläre Einsenkungen (coated pits) (Brown et al., 1998). Es wird immer noch diskutiert, ob LRP5 und LRP6 Mitglieder der LDL R Gen Familie sind, da neben den Ähnlichkeiten erhebliche Unterschiede im Aufbau bestehen (Howell and Herz, 2001). Exprimiert werden LRP5 und LRP6 in zahlreichen Geweben, die gemeinsamen sind Leber, Lunge, Prostata und Hoden, Gebärmutter, Herzen, Bauchspeicheldrüse, Skelettmuskel und Nieren (Hey et al., 1998, Dong et al., 1998, Brown et al., 1998).

1.2.8. Megalin

Im Nachfolgenden soll Megalin, der Rezeptor meines Interesses vorgestellt werden. Ich werde etwas ausführlicher auch auf Proteine eingehen, die in enger funktioneller Beziehung zu Megalin stehen.

Der Rezeptor ist der größte bisher beschriebene Vertreter der LDL R Gen Familie. Im Gegensatz zu LRP besitzt Megalin keine Furin-Schnittstelle, das Protein liegt als eine Polypeptidkette vor (Hjältn et al., 1996, Saito et al., 1994). Eine lösliche Form des Rezeptors, die in Zellkulturüberständen von Epithelzellen und im humanen Urin nachgewiesen wurde, könnte das Resultat eines alternativen Splicings sein (Moestrup et al., 1994). Der Hauptexpressionsort von Megalin im adulten Säugetier sind die proximalen Tubuli der Niere (Kounnas et al., 1992). Mit geringerer Intensität ist Megalin in Typ II Pneumozyten in der Lunge, sowie im weiblichen und im männlichen Genitaltrakt exprimiert. Beim Weibchen findet man Megalin in den Epithelzellen des Uterus, Ovidukts, Vas Deferens, der Ducti Efferentes und beim Männchen in den Initialzellen der Nebenhoden. (Saito et al., 1994, Zheng et al., 1994, Kounnas et al., 1994, Hermo et al., 1999). Die Megalin

Knockout Maus (Willnow et al., 1996a) stirbt im Allgemeinen kurze Zeit nach der Geburt, nur wenige Tiere überleben. Die Megalin Defizienz äußert sich in Abnormalitäten der Epithelien, die normalerweise Megalin exprimieren. Die Tiere sterben wahrscheinlich an Lungeninsuffizienz und Vorderhirndefekten. In der Niere spielt der Rezeptor bei der Rückgewinnung von für den Körper essentiellen Substanzen aus dem Primärharn eine entscheidende Rolle. So konnte an den überlebenden Tieren gezeigt werden, dass Megalin für die Resorption von 25-hydroxy-Vitamin D₃ im Komplex mit dem Vitamin D bindenden Protein (DBP) im proximalen Tubulus der Niere verantwortlich ist (Nykjaer et al. 1999). Die schweren Mineralisierungsstörungen (Rachitis) der Knochen bei für Megalin homozygot defizienten Tieren decken sich mit diesem Befund, da 25-hydroxy-Vitamin D₃ ein für die Kalzifikation der Knochen essentielles Steroidhormon ist. Auch das Retinoid Vitamin A im Komplex mit dem Retinol bindenden Protein (RBP) wird durch Megalin im proximalen Tubulus aus dem Primärharn wieder aufgenommen. Megalin Knockout Mäuse sind in der Regel blind oder haben erheblich kleinere Augen im Vergleich zu Kontrolltieren, was ebenfalls auf eine Retinol Defizienz hindeutet (Christensen et al., 1999a und b). Aber Megalin ist außer durch Vitamin D₃ noch auf einer weiteren Ebene in den Kalziumstoffwechsel eingebunden. Sowohl in der Nebenschilddrüse, als auch in der Niere wird Megalin von den gleichen Zellen, die auch den Rezeptor für das Parathyroidhormon (PTH) exprimieren, produziert. Megalin bindet PTH, nimmt es im Anschluss in die Zelle auf und verhindert so, dass PTH an den PTH - Rezeptor bindet und es zu einer transmembralen Signalübertragung kommt (Hilpert et al., 1999). PTH hat viele Zielgewebe und mobilisiert Kalzium. Es erhöht die tubuläre Rückaufnahme von Kalzium in der Leber und regt die Hydroxylierung von 25-hydroxy-Vitamin D₃ zu 1,25-dihydroxy-Vitamin D₃ in der Niere an. Diese wiederum erhöht die Kalziumaufnahme aus der Nahrung im Darm. Auch Vitamin B₁₂ wird im proximalen Tubulus der Niere von Megalin aus dem Primärharn rückresorbiert. Das Vitamin ist in diesem Milieu mit Transcobalamin komplexiert (Moestrup et al., 1996). Im Gehirn wird der Rezeptor während der Embryogenese vorgefunden. Dort kommt es ohne Megalin zu einer unvollständigen Entwicklung des Neuroepithels, die sich in einer Fusion

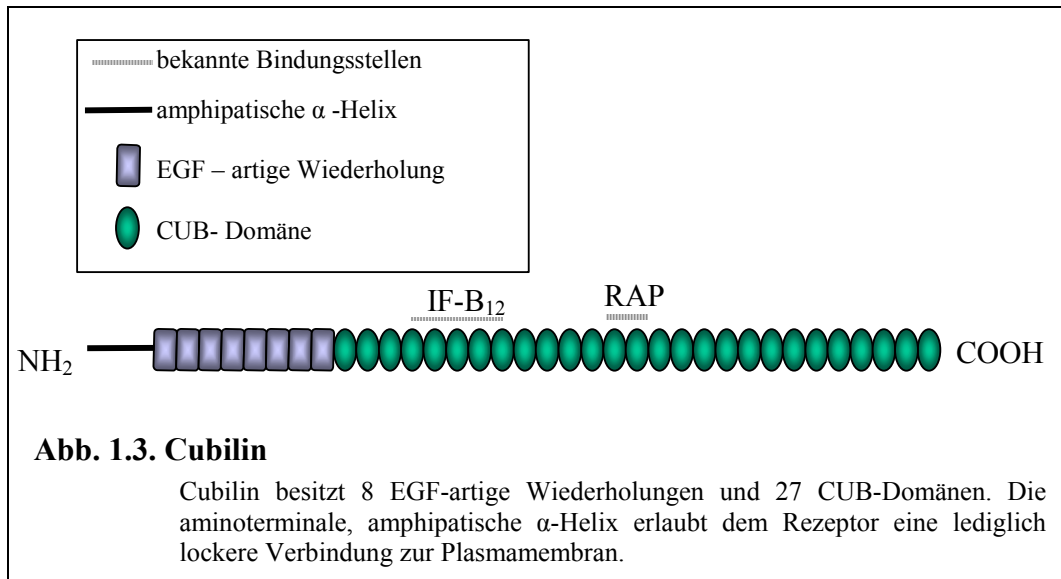
der Vorderhirnhemisphären (Holoprosenzephalie) und einem Fehlen des Geruchszentrums (olfaktorisches Organ) und des Corpus Callosum widerspiegelt. Das ventrikuläre System ist fusioniert. Die Holoprosenzephalie legt die Vermutung nahe, dass Megalin eine direkte oder indirekte Rolle in der Embryogenese spielt (Willnow et al., 1996a). Die Störungen in der Gehirnentwicklung deuten darauf hin, dass einer der wichtigsten Regulatoren dieser Mechanismen namens Sonic Hedgehog (SHH) nicht aktiviert werden kann (Herz et al., 1997). Megalin Defizienz im Neuroepithelium führt bei der Megalin Knockout Maus zu einem ähnlichen Phänotyp wie bei Mäusen oder Menschen, denen SHH selbst fehlt (Roessler et al., 1996, Chiang et al., 1996).

Das Eisen-bindende Glykoprotein Laktoferrin wurde als ein weiterer Ligand für Megalin beschrieben (Willnow et al., 1992), es bindet an die gleichen CR-Domänen des Rezeptors wie Aprotinin, Lipoprotein Lipase oder Apo E/ β VLDL-Partikel (Orlando et al., 1997). Laktoferrin ist ein 78 kDa großes Protein mit multifunktionellen Eigenschaften (Aisen et al., 1980). Produziert wird es vom Drüsenepithel der weiblichen Brust (Masson et al., 1966b) und ist in hohen Konzentrationen in der Milch der meisten Säuger zu finden (Hennart et al., 1991, Masson et al., 1971, Groves, 1960), sowie in niedrigeren Dosierungen in nasalen, intestinalen und genitalen Sekreten (Yu et al., 1993, Pentecost et al., 1987, Masson et al., 1966b). Auch in der uterinen, luminalen Flüssigkeit (ULF) ist Laktoferrin nachweisbar und wird durch Östradiol induziert (Pentecost et al., 1987, Jefferson et al., 2000). Eine physiologische Bedeutung wurde der Interaktion zwischen Megalin und Laktoferrin bisher nicht zugewiesen (Stand Juli 2002).

Ein Protein, dass zu allen Rezeptoren der LDL R Gen Familie bindet, also auch zu Megalin, ist das Rezeptor assoziierte Protein (RAP), ein 39 kDa großes Protein. Es ist ein intrazelluläres Chaperone, das in dieser Funktion für eine korrekte Faltung der Rezeptoren Sorge trägt und vorzeitige Bindung an Liganden unterbindet (zusammengefasst von Willnow, 1998). Diese Eigenschaft wird im Versuch genutzt, um RAP als Antagonisten einzusetzen und so Bindung von Liganden zu verhindern. Einhergehend mit seiner Funktion als Chaperone wird RAP normalerweise zu 70 % im Endoplasmatischen Reticulum (ER), zu 24 % im

frühen Golgi Apparat und zu sehr geringen Anteilen auf der Zelloberfläche gefunden (Bu et al., 1994, Orlando et al., 1992). Die RAP Knockout Maus bildet erstaunlicherweise keinen schweren Phänotyp aus. Die Menge an gereiftem LRP im Gehirn und der Leber von RAP defizienten Tieren ist erniedrigt und die Aufnahme von aktiviertem α_2 -Makroglobulin (α_2 -M) und Restlipoproteinen in die Leber ist reduziert (Willnow et al., 1995). Ferner ist der Transport von Megalin und VLDL R im Herz und Niere vom ER zur Zelloberfläche gestört (Willnow et al., 1995, 1996c, Birn et al., 2000b).

Interessanterweise befindet sich unter den beschriebenen Proteinen, die an Megalin binden, ein anderer großer Endozytoserezeptor namens Cubilin (Moestrup et al., 1998). Cubilin selbst hat ein Molekulargewicht von 460 kDa und seine Struktur ist ungewöhnlich (Abb.1.3.). Der Rezeptor besitzt 27 CUB (complement subcomponents C1r/C1s, Uegf, and bone morphogenic protein 1)-Domänen. Eine CUB-Domäne besteht charakteristischer Weise aus zwei Lagen von je fünf antiparallelen β -Faltblättern, die durch β -Biegungen miteinander verbunden sind. Die β -Biegungen zeigen nach außen, wo sie für eine Interaktion mit potentiellen Liganden leicht zugänglich sind (Romero et al., 1997). Am ungewöhnlichsten an Cubilin ist, dass es keine Transmembrandomäne besitzt, die für die Funktion als Endozytoserezeptor obligat wäre (Le Panse et al., 1997a und b, Birn et al., 1997 und 2000a). Stattdessen hat Cubilin eine kurze Sequenz von zirka 100 Aminosäuren, inklusive einem freien Cysteinrest und einer amphipatischen α -Helix, die den Rezeptor lose an die Plasmamembran binden (Kozyraki et al., 1998, Kristiansen et al., 1999). Cubilin wird in den Zellen des proximalen Tubulus der Niere und des absorbierenden Dünndarmepithels, sowie in der Lunge exprimiert. Während der Embryogenese wird es im visceralen Dottersack gefunden (Birn et al., 1997, Levine et al., 1984, Sahali et al., 1988, Seetharam et al., 1988,). Die vorher nie beschriebene Ansammlung von 27 CUB-Domänen lässt den Rezeptor dafür entworfen erscheinen, mit einer großen Anzahl verschiedener Liganden interagieren zu können. Unter diesen Liganden befindet sich neben Albumin (Birn et al., 2000a), DBP (Nykjaer et al., 2001) und high density lipoprotein (HDL)-Partikel (Hammad et al., 1999, 2000) im Übrigen auch RAP (Birn et al, 1997, Kozyraki et al., 1998).



Die bisher am besten untersuchte Funktion von Cubilin ist die Aufnahme von Vitamin B₁₂ im Komplex mit intrinsic factor (IF), einem seiner Transportmoleküle, im Darm (Seetharam et al., 1997, Moestrup et al., 1998).

Das im Magen produzierte IF bindet an Vitamin B₁₂. Cubilin wiederum bindet im Darm den Komplex, indem es das Transportmolekül IF erkennt. Der entstandene Komplex aus IF/Vitamin B₁₂ und Cubilin wird möglicherweise von Megalin bei der Endozytose unterstützt. Es gibt zwei bekannte Mutationen im Gen für Cubilin, die zu einer gestörten Vitamin B₁₂ Aufnahme führen. Die Krankheit wird Imerslund Gräsbeck-Syndrom genannt und äußert sich in einer autosomal rezessiven, megaloblastischen Anämie (MGA) (Kozyraki et al., 1998, Aminoff et al., 1999). In der häufigsten Variante, der finnischen Mutation 1 (FM1), ist das Bindungsvermögen der gesamten CUB-Domäne 8 beeinträchtigt, so dass die Affinität zu IF / Vitamin B₁₂ deutlich reduziert ist (Kristiansen et al., 2000). Die FM2 ist eine Punktmutation in der CUB-Domäne 6, die zu einer Splicevariante führt. Aufgrund der FM2 wird aller Wahrscheinlichkeit nach eine verkürzte Form des Rezeptors produziert (Kozyraki et al., 1998). Es sind ferner Riesenschnauzer einer Inzuchtlinie beschrieben worden, die ebenfalls nicht in Lage sind, funktionierendes Cubilin zu exprimieren. Allerdings ist bei diesen Hunden keine Mutation im Gen für Cubilin auszumachen. Daher wird angenommen, dass ein zusätzliches Genprodukt notwendig ist, um die Expression und Funktion von Cubilin zu gewährleisten (Xu et al., 1999).

Doch zurück zu den Liganden von Megalin, die als Transportproteine fungieren, also für die Beförderung lipophiler Stoffe in hydrophiler Umgebung sorgen, wie DBP, ohne das Vitamin D nicht in Blut oder Urin mobil wäre.

Wie bereits erwähnt wurde von allen LDL R Gen Familienmitgliedern anfänglichst angenommen, sie wären für die Bindung und Aufnahme von Lipoproteinen verantwortlich, da dies für den LDL R zutrifft. Nun werden immer öfter lipophile Substanzen beschrieben, die durch Megalin in ihre Zellen gelangen, dies allerdings nicht, indem sie in Lipoproteinen transportiert werden. Daher wurde ein neues Modell entwickelt, das erklären soll, auf welchem Wege diese Stoffe, wie z.B. Vitamin D und Vitamin A, in die Zielzellen gelangen:

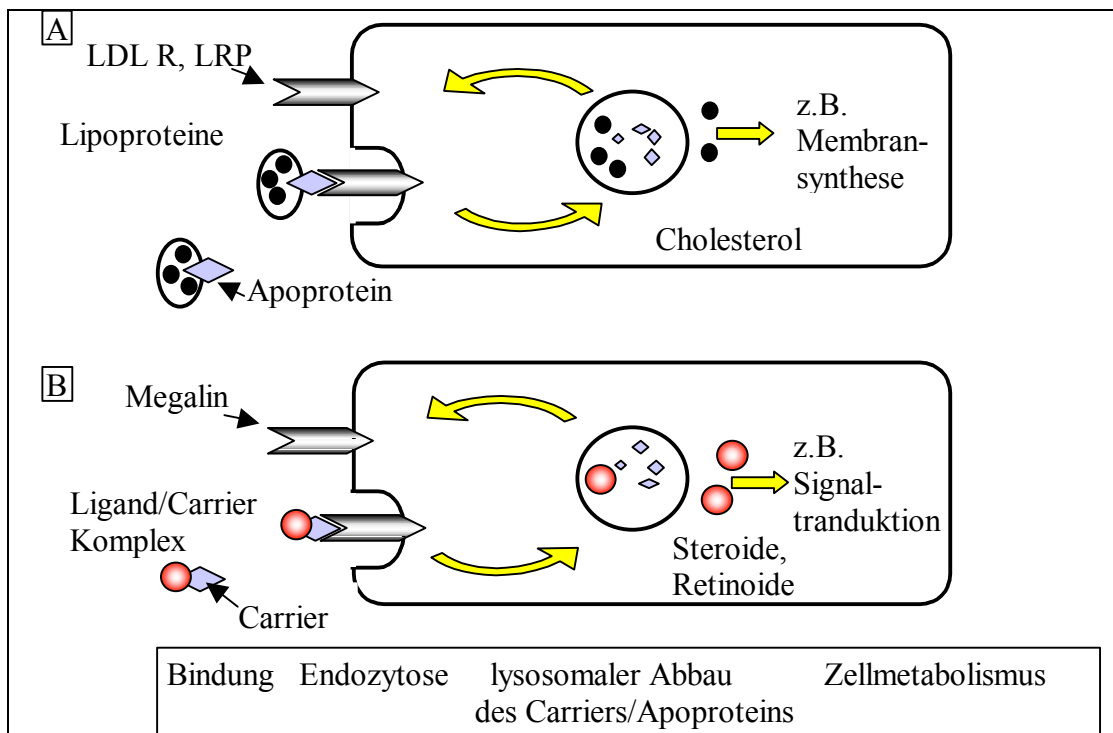


Abb. 1.4. Endozytose von Lipoproteinen und Liganden / Carrier Komplexen

A LDL R und LRP nehmen durch Endozytose Lipoproteine in deren Zielzellen auf. Lipoproteine haben einem hydrophoben Kern, in dem z. B. Cholesterol transportiert wird und eine hydrophile Hülle. In dieser Hülle sind die Apolipoproteine, über die das Lipoprotein von Rezeptor gebunden wird. Der Komplex Lipoprotein/Rezeptor wird in die Zelle aufgenommen und in Endosomen wird der Ligand vom Rezeptor getrennt. Der Rezeptor wird zurück an die Zelloberfläche gebracht, die Apolipoproteine werden in Lysosomen abgebaut und die Fette und Cholesterol stehen zur Verfügung.

B Im Falle von Vitamin D und Retinol wird ein Aufnahmemechanismus analog zur Endozytose von Lipoproteinen vermutet. Ein Rezeptor wie Megalin erkennt das Transportmolekül im Komplex aus Transportmolekül und Ligand. Der Komplex, gebunden an Megalin, wird in die Zelle aufgenommen und nach der Dissoziation vom Rezeptor und Degradation des Transportmoleküls kann der Ligand weiterverwendet werden.

Die Endozytose von Lipoproteinpartikeln durch LDL R und LRP ist gut erforscht und beschrieben. Die Rezeptoren nehmen Lipoproteine in Zellen des Zielgewebes durch Endozytose auf. Lipoproteine bestehen aus einem hydrophoben Inneren, in dem z. B. Cholesterol und Triglyzeride transportiert werden und einer hydrophilen Hülle. In der Umhüllung befindet sich Apolipoproteine. Diese geben nach Außen zu erkennen, was sich im Inneren des Lipoproteins befindet, denn die Apoproteine sind spezifisch für die im Lipoprotein transportierten Lipide. Über die Apoproteine wird das Lipoprotein von LDL R oder LRP gebunden. Durch Endozytose wird der Komplex aus Lipoprotein und Rezeptor in die Zelle aufgenommen. In Endosomen wird dann der Ligand vom Rezeptor getrennt. Während der Rezeptor zurück an die Zelloberfläche gebracht wird, werden die Apolipoproteine in Lysosomen abgebaut und die Fette und Cholesterol stehen zur Verfügung (Abb.1.4.).

Doch nicht alle Lipide werden in Lipoproteinen transportiert. Steroide und Retinoide z. B. bewegen sich im Komplex mit spezifischen Transportproteinen, sogenannten Carriern. Wir postulieren einen analogen Aufnahmemechanismus für Steroidhormone, die durch Endozytoserezeptoren in ihre Zielzellen aufgenommen werden. Ein Rezeptor wie Megalin erkennt das Transportmolekül im Komplex aus Transportmolekül und Liganden. Der Komplex, gebunden an Megalin wird in die Zelle aufgenommen und nach der Dissoziation vom Rezeptor und Degradation des Carriers kann der Ligand weiterverwendet werden.

Wegweisende Ergebnisse brachten die Arbeiten von Nykjaer und Kollegen, bzw. Christensen und Kollegen, in denen sie bewiesen, dass Megalin für die Aufnahme von Vitamin D und Vitamin A, also Retinol in Zellen des proximalen Tubulus der Niere verantwortlich ist. Die Arbeiten beweisen, dass Megalin diese Vitamine nicht selbst, sondern ihre Transportproteine bindet (Nykjaer et al., 1999, Christensen et al., 1999a).

Bisher wurden Transportproteine zwei Funktionen zugesprochen: Erstens, den Transport von hydrophoben Stoffen in hydrophilem Milieu und zweitens, die Inaktivierung dieser Stoffe durch Bindung zu ihm. Mit der Suche nach weiteren Transportmolekülen, die durch Megalin in Zellen des Zielgewebes aufgenommen werden, versuche ich die These zu untermauern, dass Transportmolekülen eine

weitere wichtige Aufgabe zufällt, indem sie bei der gewebsspezifischen Aufnahme von lipophilen Stoffen in Zielzellen unabdingbar sind.

Bislang wurde die Aufnahme von Hormonen und anderen lipophilen Substanzen in Gewebe stets durch die sogenannte „Freie Hormon Hypothese“ erklärt. Diese geht davon aus, dass die lipophilen Hormone, gelöst von ihren Transportmolekülen, via freier Diffusion durch die Zellmembran in Gewebe aufgenommen werden. Der neuen Erklärung des Aufnahmemechanismus der Steroidaufnahme würde eine weitere Konsequenz folgen. Wenn durch Endozytoserezeptoren der Komplex aus Carrier und Ligand in Zellen aufgenommen wird, kann die Aufnahme durch die Rezeptorexpression reguliert werden.

Diesem Konzept folgend, muss man Megalin aus einem neuen Blickwinkel betrachten und analysieren. Es stellt sich die Frage, in welchen Geweben der Rezeptor exprimiert wird, die in Zusammenhang mit Steroidhormonen, lipophilen Vitaminen, etc. stehen.

Die Niere als Hauptexpressionsort von Megalin ist selbst nicht steroidabhängig, doch die oben zitierten Arbeiten haben gezeigt, dass Megalin für die Aufnahme von Vitamin D/DBP und Vitamin A/RBP in Zellen des proximalen Tubulus der Niere verantwortlich ist (Nykjaer et al., 1999, Christensen et al., 1999). Eine Reihe von lebenswichtigen Substanzen werden hier aus dem Primärharn resorbiert, sowohl wasserunlösliche, als auch wasserlösliche, wie z.B. Vitamin B₁₂ (Moestrup et al., 1996). Da Megalin hier im adulten Organismus hauptsächlich exprimiert wird, wäre die Niere erste Wahl bei der Suche nach weiteren Liganden. Megalin wird sowohl in Uterus als auch Testis exprimiert, beides stark hormonabhängige Organe. Wenn Megalin also die zelluläre Aufnahme weiterer Steroide vermittelt, sollten Defizite in der Geschlechtsentwicklung bei Megalin defizienten Mäusen auszumachen sein. In Frage kämen eine ganze Reihe von Steroidhormonen, wie z. B. Testosteron, Östradiol, Progesteron, die eigene Plasmacarrier besitzen und betroffen sein könnten. Auch die Lunge ist ein lohnenswertes Organ für die Suche nach Liganden für Megalin, da Megalin defiziente Mäuse wahrscheinlich an Lungeninsuffizienz sterben. Die Lunge ist pränatal von Steroiden abhängig für eine korrekte Entwicklung (Le Souef, 2001).

Die Anzahl an Geweben, die von einer Megalin vermittelten Ligandenaufnahme direkt abhängig sind, ist sicher nicht klein aber begrenzt. Schwieriger ist die Identifizierung von Transportmolekülen, da z.B. Steroide eine Vielzahl verschiedener Transportproteine binden. Neben der Analyse Megalin exprimierender Gewebe soll daher eine zweite experimentelle Strategie verfolgt werden. Die Suche nach weiteren Transportproteinen, die notwendig für die Aufnahme lipophiler Stoffe durch Megalin sind, würde Hinweise bringen, wie diese Lipide das Zielgewebe versorgen können.

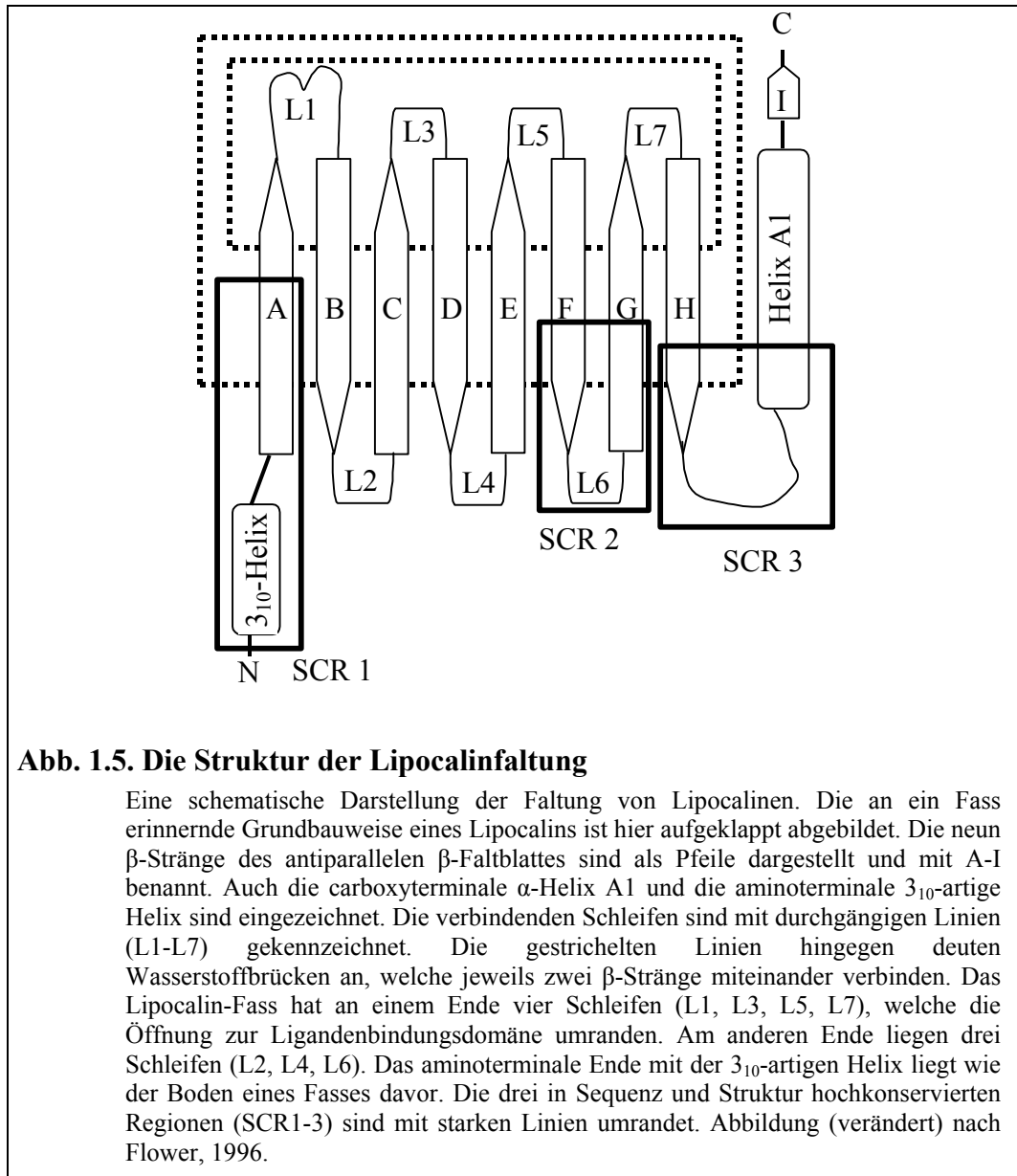
1.3. *Lipocaline*

Wie bereits vorgestellt wird das Retinoid Vitamin A im Komplex mit dem Retinol bindenden Protein (RBP) von Megalin in die Zellen proximalen Tubulus aus dem Primärharn aufgenommen (Christensen et al., 1999a und b). RBP gehört zu einer sehr umfangreichen und in ihrer Form höchst diversen Gruppe von Proteinen, den Lipocalinen. Diese Proteinfamilie ist durch einige ihrer Eigenschaften ideal geeignet für eine Suche nach potentiellen Liganden für Megalin. Ferner sind bereits zwei Vertreter der Lipocaline beschrieben, Megalin zu binden.

Man findet Lipocaline bei Vertebraten und Evertrebraten, bei Pflanzen und Bakterien. Sie sind klein (in der Regel 160-180 Aminosäuren lang), liegen meist extrazellulär vor und sind in der Lage, kleine, grundsätzlich hydrophobe Moleküle zu binden (Flower et al., 2000).

Zu den Lipocalinen gehören außer RBP auch β -Laktoglobulin, α_1 -Mikroglobulin (α_1 -M), das Mouse-major-urinary-protein (MUP), das Bilin-bindende Protein (BBP), neutrophiles Gelatinase-assoziiertes Lipocalin (NGAL), Apolipoprotein D (Apo D) und das Odorant-bindende Protein (OBP), welches im Übrigen auch ein Ligand Megalins ist (Cowan et al., 1990, Kanai et al., 1968, Ekström et al., 1975, Drayna et al., 1987, Kjeldsen et al., 1993, Huber et al., 1987). Die Namen geben bereits Auskunft über die Liganden, die von diesen Proteinen gebunden werden können. In ihrer Sequenz sind Lipocaline erstaunlich unterschiedlich. Obwohl sie viele gemeinsame Charakteristika und Funktionen besitzen (s.o.), liegt im paarweisen Vergleich die Homologie mancher Proteine bei nur 20 % (Flower et

al., 2000). Eine verbindende Gemeinsamkeit (Flower et al., 1993) ist, dass alle Vertreter ein bis meist drei hoch konservierte, kurze Sequenzmotive besitzen (Abb. 1.5. SCR 1-3). Diese Sequenzmotive definieren neben der Funktion der Proteine die Familienzugehörigkeit der Lipocaline.



Die gemeinsame Struktur aller Lipocaline ist eine symmetrische Anordnung von einem achtsträngigen β -Faltblatt, das eine Art Fass formt. Das Ende des Faltblattes liegt dem Anfang sehr nahe, die β -Stränge sind durch Wasserstoffbrücken miteinander verbunden. Dieses β -Faltblatt formt eine innere Tasche, in der Liganden gebunden werden und ein äußeres Gerüst aus Schleifen.

L2-L7 sind kurze β -Haarnadelschleifen, L1 eine große Ω -Schlinge. Diese kann sich wie ein Deckel über die Ligandenbindungsdomäne, deren Zugang auf dieser Seite liegt, legen. Zwischen den β -Strängen H und I befindet sich immer eine α -Helix. Variabel ist allerdings die Länge und die Ausrichtung im Verhältnis zum β -Faltblatt. Hoch konserviert sind die aminoternale 3_{10} -artige Helix und der ihr folgende β -Strang A (SCR 1), dann die β -Stränge F und G mit der verbindenden Schleife L6 (SCR2) und der β -Strang H mit der darauf folgenden Sequenz (Flower et al., 1993, 1995, 1996).

Im Folgenden möchte ich auf zwei Lipocaline näher eingehen, die in meiner Arbeit eine Rolle spielen werden.

1.3.1. Apolipoprotein D (Apo D)

Die Größe von Apo D liegt zwischen 19 und 32 kDa (Drayna et al., 1986, Balbin et al., 1990, Albers et al., 1981), was auf unterschiedlicher Glykosylierung beruht (Peitsch et al., 1989, Yang et al., 1994). Apo D wird in den Nebennieren, in der Bauchspeicheldrüse, den Nieren, der Gebärmutter, Milz, Lunge, in den Eierstöcken, den Hoden, in den Epithelzellen der Prostata, im Gehirn, im peripheren Nervensystem (PNS) und der zerebrospinalen Flüssigkeit (CSF) produziert (Drayna et al., 1986, Borghini et al., 1995, Aspinall et al., 1995). In der Leber und im Dünndarm hingegen, den Hauptexpressionsorten anderer Apolipoproteine, findet sich kaum Apo D. Neben der normalen Expression ist Apo D Proteinhauptbestandteil in der Zystenflüssigkeit von Frauen mit sogenannter Mastopathia cystica fibrosa, bei der die Brust teils große Zysten ausbildet (Balbin et al., 1990). Es handelt sich dabei um degenerative oder proliferative Umbauprozesse der Brustdrüsen, die sich mit Zunahme des Bindegewebes, Umbau des Lappchensystems und Erweiterung der Milchgänge bis zur Ausbildung von Zysten äußert. Die intraduktale Epithelproliferation fehlt. Apo D wird von den Epithelzellen hergestellt, die diese Zysten umgeben (Haagensen et al., 1986). Apo D kann bis über 50 % der Gesamtproteinmenge in der Zystenflüssigkeit ausmachen und in 1000fach höherer Konzentration als im Plasma vorliegen (Balbin et al., 1990, Sanchez et al., 1992a). Die normale Plasmakonzentration liegt bei 12 mg/100ml (Camato et al., 1989). Betroffen von dieser Zystenbildung sind 7 % aller Frauen vor der Menopause (Haagensen et al.,

1981). Auch wenn aus den Zysten selten direkt Tumore hervorgehen, haben betroffene Frauen ein zweifach bis vierfach höheres Brustkrebsrisiko. Die Proteinzusammensetzung der Zystenflüssigkeit variiert nach Ausbildung des Tumors. Apo D wird häufiger in Sekreten höher differenzierter, gutartiger Tumoren gefunden (88% der betroffenen Frauen), als in denen undifferenzierter, bösartiger Tumore (53% der betroffenen Frauen) (Sanchez et al., 1992 a und b).

Im PNS wird die Apo D mRNA-Expression um ein bis zu 500faches gesteigert, wenn es zu Verletzungen kommt, da es in regenerative Prozesse involviert zu sein scheint (Boyles et al., 1990, Spreyer et al., 1990). Diese hohen lokalen Konzentrationen werden erreicht, da Apo D von den Fibroblasten des PNS produziert wird, und nicht wie andere Apolipoproteine mit dem Blutstrom transportiert wird. Im zentralen Nervensystem (ZNS) wird Apo D von Oligodendrozyten und Astrozyten produziert. Diese Zelltypen synthetisieren auch Progesteron und Pregnenolon (Boyles et al., 1990, Navarro et al., 1998, Patel et al., 1995, Hu et al., 1987). Es wird angenommen, dass Apo D in der Innervierung und der Verschaltung der Neuronen beteiligt ist (Boyles et al., 1990, Provost et al., 1990, Navarro et al., 1998, Patel et al., 1995). Generell wird eine Hochregulierung von Apo D in neurodegenerativen Zuständen beobachtet. Beispiele wären die Niemann-Pick Erkrankung (Sphingomyelinose), eine autosomal rezessive Erbkrankheit, die mit veränderter zellulärer Einlagerung von Cholesterin einhergeht (Suresh et al., 1998). Alzheimer-Patienten weisen eine 60-350 % erhöhte Menge Apo D in ihren Gehirnen auf, wobei der Hippocampus und die CSF besonders betroffen sind (Terrisse et al., 1998). Für Apo D sind sehr viele Liganden beschrieben worden. Einige seien im Nachfolgenden kurz genannt. Ob Cholesterin ein natürlicher Ligand für Apo D ist, wird diskutiert (Drayna et al., 1986, Peitsch et al., 1989, Patel et al., 1997). Ganz sicher bindet Apo D diverse Steroide, dies mit unterschiedlicher Affinität. Gestagene werden besser gebunden als Androgene, diese wiederum besser als Östrogene (Simard et al., 1991). Eine Aufgabe von Apo D könnte es sein, Brustgewebe mit Progesteron und/oder Pregnenolon, einer Vorstufe des Progesteron, zu versorgen. Östradiol wird nicht von Apo D gebunden (Dilley et al., 1990, Lea, 1988). Ein weiterer Ligand für Apo D ist Arachidonsäure. Die Affinität ist mit einem K_a von $1,6 \times 10^8$ sogar

20fach höher als für Progesteron (Morais-Cabral et al., 1995). Arachidonsäure ist die Vorstufe für Eicosanoide und Prostaglandine (von Euler, 1988).

1.3.2. 24p3 / Uterocalin

24p3/Uterocalin ist das murine Homolog zu einem humanen Lipocalin namens „Neutrophile Gelatinase assoziiertes Lipocalin“ (NGAL). 24p3 ist ein zirka 26 kDa großes Lipocalin, das in vielen Geweben exprimiert wird. Die Expression ist allerdings vom Alter der Tiere abhängig (Garay-Rojas et al., 1996). In adulten Tieren wird die mRNA in Lunge und Milz, sowie Leber, jedoch nicht in der Niere detektiert (Chu et al., 1996, Garay-Rojas et al., 1996). 24p3 wird trotz des Namens Uterocalin in den Sexualorganen beider Geschlechter, also Vagina, Uterus und Nebenhoden gefunden (Huang et al., 1999, Chu et al., 2000). Obwohl die Struktur gut beschrieben wurde, sind bisher nur sehr wenige Liganden von 24p3 bekannt, darunter Retinolsäure und Retinol (Chu et al., 1997). Der Name Uterocalin bezieht sich darauf, dass 24p3 in uteriner, luminaler Flüssigkeit (ULF) gefunden wird (Albers et al., 1961). Es wird in den Epithelzellen des Endometriums produziert und in die ULF sekretiert. Östradiol stimuliert in der Proliferationsphase des Zyklus die 24p3 Expression, dies kann im Mausmodell durch künstliche Östradiol Injektionen simuliert werden (Chu et al., 1996, 2000). Auch um den Zeitpunkt der Geburt wird vermehrt 24p3 vorgefunden, es wird diskutiert, ob 24p3 dort aufgrund der weitreichenden Umstrukturierung des Gewebes zum Einsatz kommt (Liu et al., 1997). Das Protein wird nämlich den „Akute Phase Proteinen“ zugerechnet, da es als Antwort auf eine TNF α -Ausschüttung verstärkt produziert wird (Liu et al., 1995). Diese Proteine finden dort Anwendung, wo Gewebe zerstört wurde oder eine Entzündung droht. Welche Rolle 24p3 genau dabei einnimmt, ist immer noch unbekannt (Stand Juli 2002). Neben 24p3 werden im Übrigen auch die Lipocaline RBP und α_2 -M zu den „Akute Phase Proteinen“ gerechnet. Bei vielen Leukozyten verursacht 24p3 Apoptosis. Ob eine Zellart auf das Lipocalin mit gewollten Zelltod reagiert, ist nach Ansicht der Autoren von einem nicht näher beschriebenen Rezeptor für 24p3 abhängig, den nicht alle Zellen exprimieren (Devireddy et al., 2001).

1.4. CCSP

Mit Clara cell secretory protein (CCSP) möchte ich ein weiteres Protein eingehender vorstellen, das als Ligand für Megalin in Frage kommt. Zum einen fällt die erstaunliche Colokalisation der beiden Proteine auf. In der Lunge wird CCSP von Clara Zellen produziert, Megalin von den benachbarten Typ II Pneumozyten (Singh et al., 1986, Massaro, 1994, Lundgren et al., 1997). Im Uterus kommen ebenfalls beide Proteine vor, Megalin im mukosen Epithel, CCSP als lösliche Komponente in der im Uterus enthaltenen Flüssigkeit, der ULF (Saito et al., 1994, Shirai et al., 1974). Im proximalen Tubulus der Niere, dem Hauptexpressionsort von Megalin, kommt es zu einer Akkumulation von CCSP im Komplex mit polychlorierten Biphenylen (PCB). Neben der Colokalisation sind es biochemische Eigenschaften, die CCSP als potentiellen Liganden für Megalin in Frage kommen lassen.

CCSP ist ein wasserlösliches Protein, das von Clara Zellen, einem cilienlosen Zelltyp der Lunge, produziert und in die bronchioalveolare Flüssigkeit sekretiert wird. Es ist ein 16 kDa großes Homodimer, dessen Untereinheiten antiparallel durch Disulfidbrücken verbunden sind. Für diese Disulfidbrückenbildung tragen die Cysteinreste 3 und 69 Verantwortung. Jede Untereinheit enthält vier α -Helices, das Homodimer formt eine Tasche, in der kleine, hydrophobe Liganden binden können (Umland et al., 1992, Stripp et al., 1994).

CCSP der Nager, humanes CC10 und Uteroglobulin der Hasenartigen stellen interspezifische Homologe dar. Die sind Aminosäuresequenzen nicht absolut identisch, doch die funktionelle Aufteilung der drei Exons ist gleich und die entscheidenden Aminosäurereste sind hoch konserviert, wie z. B. jene, für die Ligandenbindung oder Disulfidbrückenbildung verantwortlich sind (Stripp et al., 1996). Der Namen Blastokin (Krishnan et al, 1967) oder Uteroglobulin (Beier, 1968) ist entstanden, da das Protein als hormonell induzierbare Komponente in Sekreten des Uterus die Blastulation bei Kaninchen einleitet und die Entwicklung der Blastozyste fördern konnte. CCSP ist verantwortlich für eine Akkumulation von Progesteron im Uterus (Bochskanl und Kirchner, 1981). Es bindet das

hydrophile Steroidhormon und führt dem Zielgewebe zu (Urzua et al., 1970, Arthur et al, 1972, Bochkanski et al, 1984, 1988). Später wurde CCSP in anderen Organen inklusive des Magen-Darmtraktes, der Prostata, sowie auch der Lunge nachgewiesen (Miele et al., 1987).

Das humane CCSP polychlorierte Biphenyle (PCB) bindet, ist ausführlich beschrieben worden (Lund et al., 1985, 1988, Andersson et al., 1991). Auch die Anreicherung der PCBs in der Lunge und vor allem in der Niere ist lange bekannt (Brandt et al., 1985). Bei CCSP defizienten Knockout Mäusen kommt es zu keiner Akkumulation dieser chemisch höchst stabilen und wasserunlöslichen Umweltgifte (Stripp et al., 1996). PCB wurden Mitte letzten Jahrhunderts intensiv produziert und gerade ihre hohe Stabilität und Wasserunlöslichkeit machten sie für die Elektroindustrie interessant. Bereits 1966 wurden erste Berichte veröffentlicht, die auf die Gefahren hinwiesen, die diese Stoffe in sich bargen (Jensen, 1966). Sie sind krebserregend und fruchtschädigend. Die weltweite Produktion von PCB wurde daraufhin in den siebziger Jahren gedrosselt.

2. ZIELSETZUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, weitere Hinweise über das Wirkungsspektrum des Endozytoserezeptors Megalin zu liefern. Die These, dass Megalin Steroide oder ähnliche lipophile Substanzen in ihre Zielzellen im Komplex mit Transportproteinen aufnimmt, soll durch diese Arbeit untermauert werden. Dieses wird durch zwei experimentelle Strategien verfolgt werden.

Zum einen durch die Suche nach weiteren Liganden, die Transportmoleküle für lipophile Substanzen im Plasma sind, und zum anderen durch die Analyse eines Steroidhormon abhängigen, Megalin exprimierenden Gewebes.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. *Antikörper*

Die Antikörper gegen a.) Ratten-CCSP, b.) Kaninchen-Megalin und c.) Ratten-Cubilin sind beschrieben worden von a.) Lund et al. (1988a), b.) Moestrup et al. (1993) und c.) Sahali et al. (1993). Antikörper gegen β_2 - Mikroglobulin und gegen Laktoferrin wurden von DAKO (Hamburg, Deutschland) erworben. Antikörper gegen das Myc-Epitop wurden von Sigma bezogen. Die Gewinnung polyklonaler Antikörper gegen humanes Apo D und murines 24p3 wurde von Eurogentec (Herstal, Belgien) vorgenommen. Es wurden jeweils einem Kaninchen dreimalig im Abstand von 14 Tagen 150 μ g des entsprechenden Proteins injiziert. Die Blutentnahmen fanden an den Tagen 38, 66 und 80 der Immunisierung statt. Die Antiseren wurden bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

Als sekundäre Antikörper wurden verwendet: ein Alexa 546 konjugiertes Anti-Kaninchen IgG (Molecular Probes, Leiden, Niederlande), ein Peroxidase konjugiertes Anti-Kaninchen IgG (DAKO, Hamburg, Deutschland), ein Gold konjugiertes Anti-Kaninchen IgG (British BioCell International, Cardiff, Großbritannien) und ein Peroxidase konjugiertes Anti-Schaf IgG (DAKO, Hamburg, Deutschland).

Als tertiärer Antikörper wurde ein Peroxidase konjugiertes Anti-Peroxidase IgG aus der Ziege (DAKO, Hamburg, Deutschland) genutzt.

3.2. *Verwendete Tiere und Organismen*

3.2.1. *Mäusehaltung*

Die Tiere wurden unter kontrollierten Bedingungen in einem Tag-/Nachtrhythmus von 12 Stunden gemäß dem Tierschutzgesetz gehalten und hatten freien Zugang zu Standardfutter und Wasser. Die Megalin defizienten Mäuse gp330 -/- und die dazugehörigen Kontrolltiere besaßen einen gemischten genetischen Hintergrund von 129SvEmcTer und CD1 Mäusen. Sie wurden in Willnow et al. (1996) beschrieben. Die verwendeten Wildtypmäuse besaßen einen gemischten genetischen Hintergrund von 129SvEmcTer und Balb C Mäusen.

3.2.2. *Bakterien*

Zur Herstellung Kalzium-kompetenter Bakterien wuchsen *E.coli* DH5 α über Nacht bei 37°C auf einer LB-Agarplatte (1 % Bacto-Trypton, 1 % NaCl, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % Bacto-Agar) ohne Antibiotika. Eine Einzelkolonie wurde in 50 ml LB-Medium (1 % Bacto-Trypton, 1 % NaCl, 0,5 % Hefeextrakt) expandiert. Es wurde die OD₆₅₀ der Flüssigkultur bestimmt und auf eine optische Dichte von 0,05 mit LB - Medium verdünnt. Dann wurde weitere zwei bis drei Stunden bei 37°C inkubiert, bis die Kultur eine OD₆₅₀ von 0,5-0,6 erreicht hatte. Das Wachstum der Bakterienkultur wurde auf Eis gestoppt und die Bakterien für 10 Minuten bei 4°C und 4000g abzentrifugiert. Der Zellniederschlag wurde in kalter 50mM CaCl₂ resuspendiert und 55 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation für 10 Minuten bei 4°C und 4000g. Das Bakterienpellet wurde resuspendiert in kalter Glycerin-CaCl₂ Lösung (20 % Glycerin, 50 mM CaCl₂) und über Nacht bei 0°C inkubiert. Die Zellsuspension wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.3. *SDS-PAGE und Western Blot Analysen*

SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophoresen (SDS-PAGE) wurden nach dem Protokoll von Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt.

Färbungen der Proteine mit Silbernitrat oder Coomassie Brilliant Blau G (Sigma) wurden nach Standardprotokollen vorgenommen. Als Proteinstandart wurde der vorgefärbte Blue sea 4-250 kDa Marker von Novex benutzt.

3.3.1. *Coomassiefärbung*

Für die Coomassie Färbung wurde 0,1 % Coomassie Brilliant Blue G, 1 % Essigsäure; 40 % Methanol als Färbelösung verwendet. Als Entfärber diente 5 % Methanol, 12,5 % Essigsäure.

3.3.2. *Silberfärbung*

Für eine Silberfärbung wurden die Gele in 50 % Methanol, 12 % Essigsäure, 60 mM Formaldehyd fixiert, gefolgt von dreimaligem Waschen in 35 % Ethanol. Nach einer kurzen Inkubation in 800 nM Na₂S₂O₃ und anschließendem kurzen

Waschen in ddH₂O wurde mit 3 mM AgNO₃, 900 nM Formaldehyd gefärbt, zweimal mit ddH₂O gewaschen und mit 13,8 mM NaCO₃, 600 nM Formaldehyd, 160 nM Na₂S₂O₃ entwickelt.

3.3.3. *Western Blot Analysen*

Für die Immunodetektion wurden die Gele auf Nitrocellulosemembranen der Marke Hybond C+ von Amersham transferiert (Towbin et al., 1979).

Die Membranen wurden blockiert in PBS, pH 7,4 mit 0,05 % Tween-20 (Sigma), die 5 % Magermilchpulver und 5 % fötales Kälberserum enthielt. Der Primärantikörper wurde in PBS, pH 7,4, 0,05 % Tween-20, 5 % Magermilchpulver für 45 Minuten auf der Membran belassen. Es folgten drei Waschgänge mit zweimal PBS, pH 7,4, 0,05 % Tween-20, 0,1 % SDS, 1 % NP-40 und einmal PBS, pH 7,4, 0,05 % Tween-20. Als Sekundärantikörper wurde ein Peroxidase-gekoppeltes IgG in PBS, pH 7,4, 0,05 % Tween-20, 5 % Magermilchpulver benutzt, das gegen den Primärantikörper gerichtet war. Nach nochmaligem Waschen wurde der Western Blot mit ECL (Amersham) entwickelt (Harlow and Lane, 1988).

3.4. Immunhistologie

3.4.1. *Gefrierschnitte*

Für die Gefrierschnitte wurden Megalin defiziente Mäuse und Kontrolltiere durch transkardiale Perfusion fixiert. Hierzu wird in das Herz 4 % Paraformaldehyd (Merck) in 0,1 M Natrium-Cacodylat Puffer eingeleitet. Die gesammelten Gewebe wurden zurechtgeschnitten und für eine weitere Stunde in 1 % Paraformaldehyd fixiert. Dann folgte eine Infiltration mit 2,3 M Saccharose (Sigma) und 2 % Paraformaldehyd für 30 Minuten. Schließlich wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Semidünne 0,8 µm Gefrierschnitte der Gewebe, angefertigt mit einem Kryostaten der Marke Jung CM 3000 (Leica, Wetzlar, Deutschland), wurden entweder mit Kaninchen Anti-Ratten-CCSP Antikörpern (1:10000 Verdünnung) oder Kaninchen Anti-Ratten-Cubilin Antikörpern (1:2000 Verdünnung) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dem folgte entweder ein Alexa 546 konjugiertes Anti-Kaninchen IgG, welches

unter dem Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar wurde oder ein Peroxidase konjugiertes Anti-Kaninchen IgG. Die Peroxidase wurde durch Diaminobenzidin (Fluka) sichtbar gemacht und die Schnitte wurden mit Mayers Hämalaunlösung (Merck) zwei Minuten gegengefärbt.

Für die Elektronenmikroskopie wurden ultradünne 70-90 nm Gefrierschnitte über Nacht bei 4°C mit dem Anti-Cubilin Antikörper inkubiert (1: 5000). Dem folgte ein 10 nm Gold konjugiertes Anti-Kaninchen IgG.

3.4.2. Parafinschnitte

Für die Parafinschnitte wurde hormonell synchronisierten Mäusen der Uterus entnommen und mit 4 % Paraformaldehyd in PBS pH 7,4 (GIBCO) für 24 Stunden fixiert. Die Gewebe wurden einen Tag gewässert. Dann wurden die Uteri in einer Alkoholreihe entwässert (zwei Stunden in 70% Ethanol (Roth), zwei Stunden in 90% Ethanol, über Nacht in 96 % Ethanol, drei mal zwei Stunden in 100% Ethanol und zwei mal 20 Minuten in Xylol (Roth)). Die Gewebe wurden mit Parafin (Roth) infiltriert und in Parafinblöcke gegossen. Geschnitten wurden die Gewebe mit einem Mikrotom RM 2155 (Leica, Wetzlar, Deutschland). 4 µm Schnitte der Gewebe wurden entparafiniert und rehydriert. Mit einem Ziegen Anti-Kaninchen-Megalin Antikörper wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Darauf folgten Inkubationen mit zuerst einem Peroxidase konjugierten Anti-Schaf IgG und anschließend mit einem Peroxidase konjugierten Anti-Peroxidase IgG aus der Ziege. Die Peroxidase wurde durch Diaminobenzidin sichtbar gemacht und die Schnitte wurden mit Mayers Hämalaunlösung 30 Sekunden gegengefärbt.

3.4.3. Mikroskopie

Für die mikroskopischen Untersuchungen wurde ein FluoView TFL51 und für die photographischen Aufnahmen eine DP50-Digitalkamera (beides Olympus Europe, Hamburg, Deutschland) benutzt.

3.5. Urinproben

Mittelstrahl-Urinproben von Patienten mit einem Myeloma-assoziierten Fanconi Syndrom wurden freundlicherweise von P.Aucouturier (Necker Hopital, Paris,

France) zur Verfügung gestellt. Urinproben von Patienten mit einem Imerslund-Grasbeck Syndrom wurden von O. de Baulmy (Hopital Robert Debré, Paris, France) bezogen. Kontrollurine wurden freundlicherweise von Kollegen im Labor bereitgestellt. Zum Sammeln von Urin wurden Megalin defiziente Mäuse und Kontrolltiere für 16 Stunden in metabolischen Käfigen gehalten. In ihrem Trinkwasser befand sich 16 % Saccharose. Die Urinproben (durchschnittlich 5 ml/16 Stunden) wurden auf Eis gesammelt. Die Volumina pro Stunde und die Creatininwerte waren identisch zwischen Megalin defizienten Mäusen und Kontrolltieren (durchschnittlich 0,5 mmol Creatinin/l). Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

3.6. *Lungen - Lavage*

Für eine Spülung der Lungen (Lungen-Lavage) wurden Megalin defiziente Mäuse und Kontrolltiere gemäß Tierschutzgesetz durch zervikale Dislokation getötet und in die Trachea wurde ein kurzer Schnitt gesetzt. Mit jeweils 1 ml steriler Kochsalzlösung (150 mM NaCl) wurden die Lungen gespült. Dazu wurde die Kochsalzlösung vorsichtig mit einer Spritze ohne Kanüle in die Lunge geleitet und nach kurzem Warten wieder herausgezogen. Diese Lungen-Lavage wurde zum Entfernen der alveolaren Makrophagen und sonstiger zellulärer Bestandteile 10 Minuten bei 4°C und 10000g zentrifugiert. Die Proben wurden durch Zentrifugation für 3 Stunden bei 4°C und 1500g durch eine Centricon Ultra-YM-Membran (Millipore) aufkonzentriert. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Bradford-Reagenz der Firma Bio-Rad bestimmt und die Proben wurden bis zur weiteren Untersuchung bei -80°C gelagert.

3.7. *Synchronisierung des Zyklus*

Zur hormonellen Synchronisation der Megalin defizienten Mäuse und Kontrolltiere wurden ihnen über 4 Tage täglich Hormone s.c. injiziert. Hierzu wurden geschlechtsunreife, 21 Tage alte Jungtiere verwendet. Die erste Gruppe erhielt 1 µg 17β-Östradiol (Sigma)/Tag in 100 µl handelsüblichem Speiseöl, eine zweite Gruppe erhielt 1 mg Progesteron (Sigma) und 1 µg 17β-Östradiol in 100 µl Speiseöl/Tag, den Kontrolltieren wurde lediglich 100 µl Öl gespritzt.

3.8. Uterine luminale Flüssigkeit (ULF)

3.8.1. Gewinnung

Zum Erhalt der uterinen luminalen Flüssigkeit (ULF) wurden die im Zyklus synchronisierten Tiere durch zervikale Dislokation getötet, die Uteri entnommen und mit 100 µl 150 mM NaCl Lösung gespült. Dazu wurde durch eine sehr feine Kanüle (23g, B&D) die Kochsalzlösung in die Uteri gespritzt und zur Entnahme der Flüssigkeit wurde am nach unten hängenden Ende ein Loch in das Gewebe geschnitten. Größere Bestandteile in der ULF wurden durch eine Zentrifugation mit 10000g für 5 Minuten bei Raumtemperatur entfernt. Danach wurde 10 mM EDTA-Lösung zugegeben, so dass daraus eine Endkonzentration von 1 mM resultierte. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bestimmt und die Proben wurden bis zur weiteren Untersuchung bei -80°C gelagert.

3.8.2. Aufreinigung des Megalin - bindenden Bestandteils in der ULF

Uterine luminale Flüssigkeit von mit 17β - Östradiol behandelten Wildtypmäusen wurde durch Gel-Filtration (Superose 12 HR 10 / 30 von Amersham) aufgereinigt. Dazu wurde ULF auf die Säule geladen und mit 20 mM Tris, pH 8,0 eluiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden einerseits mit 4-16 % SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert und gleichzeitig wurde durch BIAcore Analyse überprüft, welche der Fraktionen das an Megalin bindene Protein enthielten. Diese und die beiden flankierenden Fraktionen wurden über eine Mono-Q Säule (Amersham) weiter aufgereinigt. Zur Elution diente ein Salzgradient von 0-1 M NaCl in 20 mM Tris, pH 8,0. Wieder wurden die Fraktionen einerseits mittels BIAcore Analyse überprüft, andererseits auf einem 4-16 % Gel aufgetrennt. Das Gel wurde mit Silbernitrat gefärbt. Die einzige Proteinbande der Fraktion, die eine Bindung an Megalin zeigte, wurde aus dem Gel ausgeschnitten und nach einer Trypsinierung von der Firma Profundis-biotech (Aarhus) mit Hilfe von MALDI-MS analysiert.

3.9. Klonierung der Konstrukte ApoD und 24p3

3.9.1. Primer

Humane ApoD cDNA wurde durch PCR amplifiziert. Hierzu wurde der Klon IMAGp998D042074Q2 (RZPD, Berlin, Deutschland) als Vorlage benutzt.

Als Primer für die PCR dienten die Oligonukleotide

5'- gcc cgc tag cac aag cat ttc atc ttg gga agt gcc-3' und

5'-caa tga ctg cgg ccg ctt acg aga gct tgg ggc agt tca c-3'.

Murine 24p3 cDNA wurde durch PCR amplifiziert. Hierzu diente der Klon IMAGp998K238789 (RZPD, Berlin, Deutschland) als Vorlage.

Als Primer für die PCR dienten die Oligonukleotide

5'-gct agc cca gga ctc aac tca gaa ctt gat ccc t-3' und

5'- gcg gcc gct cag ttg tca atg cat t-3'.

Jedes dieser Primerpaare war so konstruiert, dass eine Nhe I Restriktionsstelle vor und eine Not I Restriktionsstelle nach dem Insert eingefügt wird. Ferner wurden Stopcodons an geeigneter Stelle eingefügt.

3.9.2. Amplifikation durch PCR

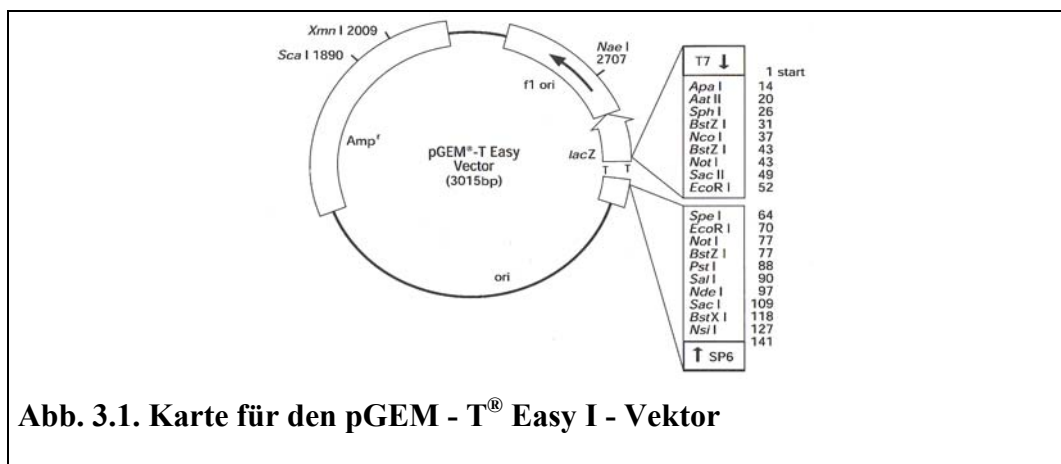
Die gewünschten DNA-Bereiche wurden mit einer Soriano-PCR (Soriano et al. 1991) amplifiziert. Ein 25 µl PCR-Ansatz enthielt außer 1 µl Matrizen-DNA in verschiedenen Konzentrationen 2,5 µl 10x Gitschier-Puffer (166 mM Ammoniumsulfat, 670 mM Tris-HCl, pH 8,8, 67 mM MgCl₂, 50 mM β-Mercaptoethanol, 67µM EDTA), 2,5 µl DMSO, 1,25 µl einer dNTP-Mischung (jeweils 2,5 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 1,25 µl BSA (1,6 mg/ml), 0,2 µl jeweils des 5'- und 3'Primers (0,1 µg / µl), 0,125 µl Taq DNA-Polymerase (5 U/µl). Es wurden folgende Temperaturen und Zeiten eingestellt: einmal 93°C für 3 Minuten, einmal 55°C für 5 Minuten, einmal 65°C für 5 Minuten, vierzigmal 93°C für 30 Sekunden, dann 55°C für eine Minute, dann 65°C für 3 Minuten. Es folgt ein abschließender Zyklus mit je einmal 93°C für 3 Minuten, 55°C für 3 Minuten, 65°C für 10 Minuten und schließlich 4°C bis zur Entnahme der PCR.

3.9.3. Ligation in den pGEM - T[®] Easy I - Vektor

Direkt aus dem Reaktionsgefäß für die PCR wurden 3 µl des amplifizierten DNA-Fragments mit 5 µl 2x Rapid Ligation Puffer[®] für T4 Ligase, 1 µl (= 50 ng) linearisiertem pGEM - T[®] Easy I – Vektor (Abb.3.1.) und 1 µl T4-Ligase (3 U/µl) gemischt und bei 16°C über Nacht inkubiert.

3.9.4. Transformation in Kalzium - kompetente E.coli Bakterien

Nach erfolgreicher Ligation des Fragments in den Vektor wurde das Konstrukt in Ca⁺⁺-kompetente DH5α Zellen transformiert. 100 µl Ca⁺⁺-kompetente DH5α wurden mit 100 ng Vektor-DNA gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgten Inkubationen von zwei Minuten bei 37°C und einer Minute auf Eis. Nach Zugabe von 200 µl LB-Medium wurden der Ansatz für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die transformierten Zellen wuchsen über Nacht bei 37° C auf einer Selektionsagarplatte mit Ampicillin (200µg/ml).



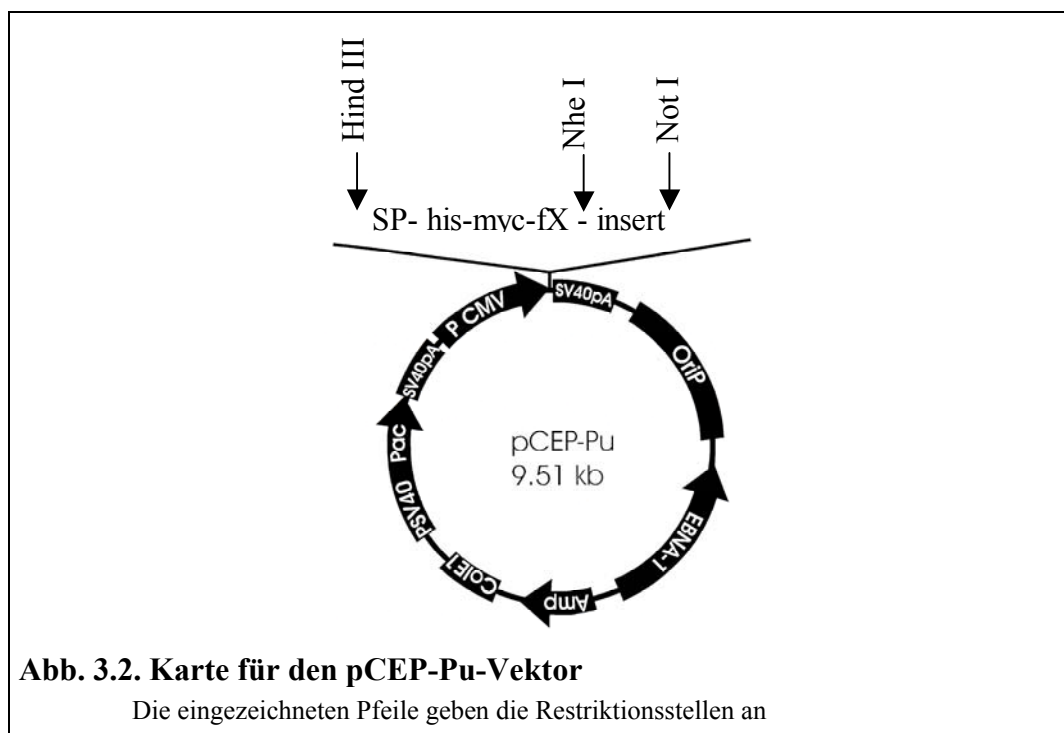
3.9.5. DNA-Isolierung

Zur Umklonierung in den Zielvektor wurden Einzelkolonien von der Agarplatte in Ampicillin-haltigem (50 µg/ml) LB-Medium (1 % Bacto-Trypton, 1 % NaCl, 0,5 % Hefeextrakt) überimpft und über Nacht bei 37°C vermehrt. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in 25 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM Glukose, 2,5 mM EDTA, 5 % RNase A resuspendiert. Die gleiche Menge 0,2 N NaOH, 1 % SDS lysierte die Zellen. Nochmals dieselbe Menge 3 M Kaliumacetat, 11,5 % Essigsäure enteiweißte das Gemisch, und bei 14000g und 4°C wurden die Zelltrümmer für 10 Minuten abzentrifugiert. Es folgte eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol

(25/24/1) Extraktion, der die obere, wässrige Phase abgenommen und mit dem 2,5-fachen Volumen absoluten Ethanols ausgefällt wurde. Die DNA wurde mit 14000g bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und mit 70% Ethanol von Salzen befreit. Die präzipitierte DNA wurde in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) gelöst.

3.9.6. Umklonierung in den Zielvektor pCEP-Pu-SP-his-myc-fX

Aus dem so erhaltenen Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen Nhe I und Not I (Amersham), sowie einem one-for-all Puffer (Amersham) über Nacht bei 37°C das Insert geschnitten. Der Ansatz lief über ein 0,8 %iges Agarosegel (Gibco) und die durch Ethidiumbromid (Merck) unter UV-Licht sichtbare Bande wurde ausgeschnitten. Mit Hilfe des QIAquick®-Kits der Firma Qiagen wurde die DNA aus dem Gel gemäß Protokoll der Firma extrahiert und konnte anschließend in den Zielvektor pCEP-Pu-SP-his-myc-fX (Abb.3.2.) ligiert werden.



Hierzu wurden 4U T4 DNA Ligase (4 U/μl) von Roche, 2 μl Ligasepuffer (10 x-Konzentrat: 500 mM Tris-HCl, 70 mM MgCl₂, 10 mM DTT), 1 mM rATP, sowie Insert- und Vektor-DNA in Verhältnis von 10:1 und einem Gesamtvolumen von 20 μl für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach erfolgreicher Ligation wurde die

DNA wie oben beschrieben in *E.coli* Zellen transformiert und danach expandiert. Nach erneuter DNA-Extraktion aus Bakterien wurde zuerst die Sequenz verifiziert. Die Firma Invitex (Berlin, Deutschland) sequenzierte alle Konstrukte. Danach konnte dieser Expressionsvektor pCEP-Pu-SP-his-myc-fX mit den Konstrukten in das eukaryotische Expressionssystem der 293-EBNA Zellen von Invitrogen transformiert werden. 293-EBNA Zellen haben den Replikationsfaktor EBNA-1 des Epstein Barr Virus stabil im Genom integriert und produzieren ihn kontinuierlich. Charakteristisch für den Expressionsvektor pCEP-Pu-SP-his-myc-fX wiederum ist es, dass die Genexpression vom Promoter des Cytomegalovirus angetrieben wird (Kohfeldt et al., 1997). Dieser Expressionsvektor hat den Startpunkt (origen) des Epstein Barr Virus. In Anwesenheit des Replikationsfaktors EBNA-1 wird das Plasmid ständig repliziert. Die durch die Konstrukte exprimierten Proteine enthielten am aminoterminalen Ende einen Anhang von sechs Histidinresten, ein Myc-Epitop und eine Faktor Xa-Restriktionsstelle. Die Histidinreste dienten zur Aufreinigung des Proteins durch Nickel-Affinitätschromatographie. Die Myc-Epitope konnten durch kommerziell erhältliche Antikörper erkannt werden und ließen den Nachweis der Fusionsproteine in der Western-Blot Analyse zu. Die Faktor Xa-Restriktionsstelle ermöglichte eine Abtrennung des gesamten Anhanges.

3.10. Zellkultur

3.10.1. Generelle Zellkulturbedingungen

Für diese Arbeit wurden Karzinomazellen des Dottersackes aus der braunen, norwegischen Ratte (BN16) und humane embryonale Nierenzellen (293-EBNA Zellen) von Invitrogen verwendet. BN16 Zellen wurden in Standardmedium, d.h. in DMEM (Biochrom), dem 10 % fötales Kälberserum (FCS) von Biochrom, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) von Gibco zugesetzt waren, kultiviert. Für die Aufnahme- und Degradationsversuche wurden BN16 Zellen kurz vor Versuchsbeginn auf DMEM ohne Glutamin (Gibco) umgestellt, welches 0,2 % BSA (Sigma) und Penicillin/Streptomycin in den oben genannten Konzentrationen enthielt. Die 293-EBNA Zellen wuchsen in Standardmedium,

mit 250 µg/ml G-148 Sulfat (Gibco). Die Zellkulturinkubatoren (Heraeus) stellten eine Atmosphäre mit 5 % CO₂ und eine Temperatur von 37°C sicher.

3.10.2. Expression von ApoD und 24p3 in 293-EBNA Zellen

293-EBNA Zellen wurden mit den unterschiedlichen Konstrukten mittels Elektroporation transformiert. Hierzu wurden den Zellen in der Zellkulturschale das Medium abgesaugt. Dann wurden die Zellen mit PBS pH 7,6 gewaschen. Nach einer kurzen Inkubation mit Trypsin (0,05 %) /EDTA (0,02 %)-Lösung (Gibco) bei 37°C wurden die abgelösten Zellen in Medium aufgenommen und durch eine kurze Zentrifugation bei 500 g und Raumtemperatur vom Überstand abgetrennt. Es folgten zwei Waschschrte der Zellen, der erste mit Medium, der zweite mit PBS, pH 7,6. Danach wurden die Zellen zweimal mit 25 mM NaCl in Standardmedium vorbehandelt, um nach Zugabe der DNA mit 230 mV und 500 µFD im Gene Pulser der Firma Bio-Rad elektroporiert zu werden. Die transformierten 293-EBNA Zellen wurden in DMEM kultiviert, das mit 10 % FCS, 250 µg/ml G-418 Sulfat und 1 µg/ml Puromycin (Sigma) versetzt war. Zur Produktion von konditioniertem Medium wurde auf das Puromycin verzichtet und die Menge an FCS reduziert. Zur erfolgreichen Expression von Apo D war 2,5 % , für 24p3 5 % FCS im Erntemedium notwendig. Das konditionierte Medium wurde alle zwei bis drei Tage gesammelt und durch frisches Medium ersetzt.

3.10.2. Herstellung eines Membranextraktes aus Dottersackzellen (BN16)

Es wurden BN16 Zellen in einer Zellkulturschale das Medium abgesaugt. Dann wurden die Zellen mit PBS pH 7,6 gewaschen und abgekratzt. Durch eine kurze Zentrifugation bei 500g und 4°C wurden die Zellen vom Puffer abgetrennt. Nach Feststellung des Gewichts wurde Lösung A (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 2 mM Magnesiumchlorid, 0,25 mM Saccharose, 250 µM PMSF) in einem Volumen von 150 µl pro 100 mg Protein zu den Zellen gegeben. Mit Hilfe eines Potters (Glas Cal, Terre Haute, USA) wurden die Zellen homogenisiert. Die gröberen Zelltrümmer wurden für zehn Minuten mit 1000g bei 4°C abzentrifugiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation für zehn Minuten mit 10000g bei 4°C zur Entfernung der Zellkerne. Der Überstand wurde 45 Minuten mit 100000g bei 4°C

zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 5µl Lösung B (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 2 mM MgCl₂, 80 mM NaCl, 1mM PMSF) pro 100 mg Ausgangsgewicht resuspendiert. Zur Homogenisierung wurde die Membranfraktion durch fortgesetzt kleiner werdende Injektionsnadeln (18g, 22g, 25g) gedrückt. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bestimmt und die Proben wurden bis zur weiteren Untersuchung bei -80°C gelagert.

3.11. Aufreinigung und Darstellung der Proteine

3.11.1. RAP

Rekombinante Glutathion S-Transferase (GST) oder einem Fusionsprotein aus Glutathion S-Transferase und Rezeptor-assoziiertem Protein aus der Ratte (GST-RAP) wurden in DH5α Bakterien produziert, wie bereits beschrieben (Herz et al., 1991). Dazu wurden *E.coli* Bakterien des Stammes DH5α, die das GST oder GST-RAP Expressionskonstrukt enthielten bei 37°C bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,4-0,5 hochgezogen. Eine Zugabe von Isopropylthio-β-D-Galaktosid (Endkonzentration 0,01 % (w/v)) induzierte die Expression. Die Kulturen wuchsen 4-6 Stunden bei 30°C. Mit einer Zentrifugation bei 4°C und 5000 g wurden die Zellen geerntet. Der Zellschlag wurde in $\frac{1}{100}$ des anfänglichen Volumens in 15 % (w/v) Saccharose, 50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8,0 resuspendiert. Es wurde Lysozym (1 mg/ml) zugefügt und weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde eine wässrige Lösung von 2 % Triton X-100 und 0,5 mM Phenylsulfonylfluorid in einem Volumen von $\frac{1}{50}$ des Ausgangsvolumens mit der Bakteriensuspension vermischt. Die Reagenzgefäße wurden geschüttelt und die Lysate wurden durch fortgesetzt kleiner werdende Injektionsnadeln (18g, 22g, 25g) gedrückt. Dithiothreitol (DTT) in einer Endkonzentration von 1 mM und Glutathionagarose wurden zugegeben und die Mischung wurde über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Dann wurde die Agarose mit 500 g abzentrifugiert und dreimal mit Puffer A gewaschen (20 mM HEPES, pH 7,6, 100 mM KCl, 0,2 mM EDTA, 20 % Glycerol, 1 mM DTT, 0,5 mM Phenylsulfonylfluorid). Die Agarose wurde in dem gleichen Puffer resuspendiert und mit der Agarosesuspension wurde eine Säule von 1 cm Durchmesser gepackt. Nach nochmaligem Waschen mit Puffer A wurde GST-RAP oder GST mit Puffer

A, der zusätzlich 25 mM Glutathion enthält (mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt) von der Säule eluiert. Fraktionen von 1 ml wurden gesammelt, die das Protein enthielten vereinigt und gegen 0,2 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 8,0 dialysiert.

3.11.2. CCSP

CCSP aus einer Lungenwaschung bei der Ratte und rekombinantes Ratten-CCSP wurden wie bereits beschrieben (Lund et al., 1988b; Hard et al., 1995) gereinigt. Beide Ratten-Proteine wurden freundlicherweise von J. Lund (Lund, Schweden) zur Verfügung gestellt.

3.11.3. ApoD und 24p3

Diese gesammelten ApoD- und 24p3-haltigen Zellüberstände wurden über Nacht gegen Grundpuffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8,0) dialysiert und dann über eine Ni-NTA Superflow Säule gegeben (Qiagen). Die Säule wurde mit Grundpuffer, der 20 mM Imidazol enthielt, gespült. Die Elution des Proteins erfolgte mit 400 mM Imidazol in Grundpuffer. Eine Konzentrationsbestimmung wurde vorgenommen und die Reinheit des Eluats wurde mittels SDS - PAGE und anschließender Färbung durch Silbernitrat oder Coomassie Brilliant Blue G überprüft. Zur Abspaltung des aminoterminalen Anhangs wurden jeweils 50 µg Apo D oder 24p3 für 18 Stunden bei 37°C mit 1 µg Faktor Xa verdaut (Sigma)

3.12. ¹²⁵Jod – Markierung der Proteine

Die Proteine CCSP, GST-RAP und Apo D wurden mit ¹²⁵Jod (Amersham) radioaktiv markiert mit der IODOGEN-Methode (Fraker und Speck, 1978).

Dazu wurden 30-40 µg Protein mit 2 µl ¹²⁵Jod (entspricht 220 µCi oder 7,4 MBq) für 5 Minuten (CCSP und Apo D) oder 15 Minuten (RAP) in ein Reaktionsgefäß mit Iodogen (200 µg) gegeben. Eine Abtrennung von ungekoppeltem Jod erfolgte mit einer Sephadex G-25 Säule (PD-10 desalting columns von Amersham), die zuvor mit 0,25 % BSA in PBS, pH 7,6 equilibriert wurde. Dazu wurde das Reaktionsgemisch in die Säule einlaufen gelassen und mit glutamin- und serumfreiem DMEM mit 0,2 % BSA und Penicillin/Streptomycin in den oben genannten Konzentrationen eluiert. So wurde das radioaktive Protein von freiem

^{125}Jod getrennt. Es wurden 0,5 ml Fraktionen gesammelt und die Radioaktivität im γ -Counter 1470 Wizard (Wallac) gemessen. Die Radioaktivität/ng Protein wurde errechnet und die Probe bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.13. *in vitro* Aufnahme - und Degradationsstudien

3.13.1. *Degradationsassay*

Die zelluläre Aufnahme und Degradation radioaktiv markierter Proteine wurden an BN16 Zellen untersucht. Diese Zellen wurden für diese Versuche vom Standardmedium auf glutamin- und serumfreies DMEM mit 0,2 % BSA und Penicillin/Streptomycin in den oben genannten Konzentrationen umgestellt. 30 Minuten vor Zugabe der radioaktiv markierten Proteine wurden zu den Zellen die Antikörper (200 $\mu\text{g/ml}$), GST (50 $\mu\text{g/ml}$), GST-RAP(100 $\mu\text{g/ml}$) oder Chloroquin (200 μM) gegeben. Die ^{125}Jod - markierten Liganden wurden zum Kulturmedium gegeben und in den angegebenen Zeitintervallen wurde die zelluläre Degradation nach Standardprotokollen gemessen (Goldstein et al., 1983). Hierzu wurde der Zellüberstand 1:3 mit 15 % Trichloressigsäure (TCA) von Merck gemischt, fünf Minuten bei 10000g zentrifugiert und der Überstand im γ -Counter gemessen. Die Degradation wurde ausgedrückt in Nanogramm des nicht durch TCA fällbaren Proteins im Zellkulturmedium, pro mg Gesamtzellprotein.

3.13.2. *Steroid - Bindung*

Zur Bindung von ^3H -markiertem Progesteron (Amersham) wurden 750 pmol des Steroids mit 600 pmol Apo D in einem Glasgefäß für 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurde der Komplex von ungekoppeltem Steroid und Apo D getrennt, indem man das Reaktionsgemisch über eine Sephadex G-25 Säule aufreinigete. Es wurden 0,5 ml Fraktionen gesammelt und die Ausbeute an Komplex wurde im Scintillationszähler LS 3801 (Beckmann, Berlin, Deutschland) bestimmt.

3.14. BIAcore Analysen

Eine Quantifizierung der Bindung der verschiedenen Liganden an die unterschiedlichen Rezeptoren wurde durch BIAcore Analysen (Biosensor, Schweden) vorgenommen, bereits beschrieben von Nykjaer et al., 1999.

Zur Herstellung eines Rezeptorchips wurde ein kontinuierlicher Strom von 5 μ l HBS Puffer (10 mM HEPES, 3,4 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,005 % Surfactant P20, pH 7,4) pro Minute über die Sensoroberfläche eingestellt. Die carboxylierte Dextran-Matrix der Sensorchip-Durchflusszelle wurde aktiviert durch eine Zugabe von 60 μ l einer Lösung von 200 mM N-Ethyl-N'-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimid und 50 mM N-Hydroxysuccimid. Danach wurden 180 μ l 10 mM Natriumazetat, pH 4,5 mit 10 μ g/ml Kaninchen-Megalin oder Kaninchen-Cubilin, rekombinantes Apo E R 2, LRP oder VLDL R in die Messzelle injiziert. Die verbleibenden Bindungsstellen wurden durch eine darauf folgende Injektion von 35 μ l 1 M Ethanolamin, pH 8,5 blockiert. Die Bindung des immobilisierten Rezeptors an den Chip wurde in BIAcore response units (RU) ausgedrückt und war gleichbedeutend mit 25 fmol Megalin/mm², 40 fmol Cubilin/mm², 32 fmol/mm² VLDLR, 25 fmol/mm² LRP und 8 fmol/mm² Apo E R 2. Zur Bestimmung der Bindungsstärke wurden die Liganden in 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1,5 mM CaCl₂, 1 mM EGTA, pH 7,4 zu dem CM5 BIA Sensorchip gegeben, auf dem Megalin oder Cubilin immobilisiert war. Im Falle einer spezifischen Bindung erfolgte ein optisches Signal. Der relative Anstieg an response units (RU) gegenüber Kontrollen wurde bestimmt. Zwecks genauer Bestimmung der Bindungsaffinität zu Cubilin wurden verschiedene Konzentrationen der Liganden der BIAcore Analyse unterzogen. Die kinetischen Parameter wurden mit der BIAevaluation 3.0-Software ausgewertet.

3.15. Quantifizierung von RNA - Expression durch TaqMan[®] PCR

3.15.1. RNA - Präparation

Megalin defiziente Mäuse und Kontrolltiere, sowie Wildtypmäuse wurden über vier Tage hormonell synchronisiert. Dann wurden den Mäusen die Uteri entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Noch tiefgefroren

wurden die Organe zu Trizol (Roth) gegeben (für 50-125 mg Uterus 1,0 ml Trizol, für 125-200 mg Uterus 1,5 ml Trizol). Die Uteri wurden in einem Polytron PT 20-Homogenisator (Ika Labortechnik) homogenisiert und 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dieses Homogenisat wurde mit 0,2 ml Chloroform (Sigma)/ml Trizol gemischt und 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zelltrümmer wurden mit einer Zentrifugation für 30 Minuten bei 12150 g und 4°C abgetrennt, der klare Überstand wurde mit 0,5 ml Isopropanol (Sigma) pro ml gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die RNA wurde bei 13200g und 4°C für 15 Minuten abzentrifugiert und der Niederschlag wurde in 70% Ethanol/DEPC-ddH₂O resuspendiert (zur Herstellung von DEPC-ddH₂O wird ddH₂O mit 0,01 % DEPC (Diethyl-pyrocbonat von Roth) über Nacht inkubiert und anschließend autoklaviert). Die RNA wurde ein weiteres Mal für acht Minuten bei 4°C und 5160 g abzentrifugiert und nach Entfernung des Überstandes an der Luft für 15 Minuten getrocknet. Die gewonnene RNA wurde in 100 µl DEPC-ddH₂O aufgenommen und 10 Minuten bei 55°C unter Schütteln gelöst. Nach photometrischer Bestimmung der RNA-Konzentration wurden die Proben bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert.

3.15.2. *Synthese von cDNA*

Um aus einer RNA-Matrize einzelsträngige cDNA zu erhalten, musste eine reverse Transkription durchgeführt werden. Da die Gesamt-RNA umgeschrieben werden sollte, wurde als Primer ein aus vielen kurzen Oligonukleotiden bestehender Random-Primer gewählt, so dass mehrfache, unspezifische Bindungen über die gesamte RNA erfolgten. Es wurde der Superscript II Kit von Gibco benutzt. 2 µg RNA wurden mit 1,8 µl Random-Primer und ddH₂O (22,2 µl - Volumen der RNA) gemischt, 10 Minuten bei 65°C inkubiert und danach auf Eis gestellt. Anschließend wurden 8 µl (5x) firststrand buffer, 4 µl DTT (100 mM) und 2 µl einer dNTP-Mischung (jeweils 10 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP) zugegeben und zwei Minuten bei 42°C inkubiert. Nach der Zugabe von 2 µl Superscript wurde die Mischung 10 Minuten bei Raumtemperatur, eine Stunde bei 42°C und 10 Minuten bei 70°C inkubiert.

3.15.3. *Primer und TaqMan[®] Probes*

Die genutzten Primer und TaqMan[®] Probes waren die folgenden:

Für Megalin:

Megalin forward: 5'-tgc acg gag gaa gtt gct att- '3

Megalin reverse: 5'-tcc act gta gcc gct aga aca c- '3

Megalin Sonde: 5'-Fam tga tga gaa tga cct ccc caa atg ca-'3 Tamra

Für Murine Collagenase-like A (MCOL A)

MCOL forward: 5'-tga aga agc cca ggt gtg g- '3

MCOL reverse: 5'-ggg cca acg agg att gtt gtg- '3

MCOL Sonde: 5'- Fam cct gat gtg gcc cca tat gcc att ac- '3 Tamra

3.15.4. *TaqMan[®] PCR*

Bei der quantitativen RT-PCR (TaqMan[®] PCR) erfolgt die Quantifizierung während der Amplifikation. Dieses ist möglich durch den Einsatz sequenzspezifischer Primer und einer fluorogenen Sonde. Sie besteht aus einem Oligonukleotid, dessen 5'-Ende mit einem Fluoreszein-Derivat markiert ist, während das 3'-Ende als Quencher-Farbstoff ein Rhodamin-Derivat trägt und außerdem mit einem Phosphatrest blockiert ist (Lee et al. 1993). Der verwendete Reporter-Farbstoff 6-Carboxy-Fluoreszein wird bei einer Wellenlänge von 488 nm zur Fluoreszenz angeregt, was allerdings durch seine Nähe zum Quencher-Farbstoff durch einen Fluoreszenz-Energietransfer unterdrückt wird. Dieses ist die Situation bei einer intakten Sonde. Bei der Amplifikation wird die hybridisierte Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease Aktivität der Taq-Polymerase hydrolysiert. Dadurch wird die räumliche Nähe der Reporter- und Quencher-Farbstoffe aufgehoben und es kommt zu einem Fluoreszenzsignal. Der Anstieg der Fluoreszenz ist der Amplifikation direkt proportional und kann zur Quantifizierung genutzt werden. Die gemessene Expressionen von Megalin und Murine Collagenase-like A (MCOL A) wurden auf die Expression des Glykolyseenzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert, welches in jeder Zelle in gleichen Mengen synthetisiert wird. Es wurden Standardreihen mit jeweils vier Verdünnungen (1:1, 1:2, 1:4, 1:8) für

Megalin, MCOL und GAPDH erstellt. Die quantitative RT-PCR wurde mit dem TaqMan[®]-EZ Kit von Perkin Elmer gemäß Protokoll durchgeführt. Dazu werden 1 µl DNA mit 9 µl ddH₂O, je 0,75 µl reverse und forward Primer, 1 µl Sonde, 12,5 µl PCR Master Mix gemischt. Es wurden folgende Temperaturen und Zeiten eingestellt: zwei Minuten 50 °C, zehn Minuten 95°C, 15 Sekunden 95°C, eine Minute 60°C. Dieser Zyklus wurde 45 x wiederholt. Zur Analyse wurde der Gene Amp 5700 Sequence Detector von Abi genutzt. Die Rohdaten aus dem TaqMan – Report wurden zuerst gemittelt, da in Triplets gemessen wurde. Dann wurde der Mittelwert auf den Mittelwert der GAPDH-Expression normalisiert. Schließlich wurde die kleinste gemessene Expression als Standard gesetzt und der Unterschied an normalisiertem Reportersignal errechnet (Δ RN).

4. ERGEBNISSE

4.1. *Allgemeines*

Es werden mehr und mehr Mitglieder der low-density lipoprotein (LDL) Rezeptor Gen Familie beschrieben und noch schneller wächst die Anzahl der beschriebenen Liganden für einzelne Familienmitglieder. Zunächst wurde davon ausgegangen, dass die sowohl von Säugern, als auch von anderen Gattungen gebildeten Zelloberflächenrezeptoren lediglich die Aufnahme von Lipoproteinen in die Zellen vermitteln. Inzwischen ist bekannt, dass die Rezeptoren mannigfache Rollen in zellulären Prozessen spielen. Dieses ist möglich, indem sie unterschiedliche Liganden in verschiedenen Gewebearten erkennen, und in die Zellen aufnehmen oder durch sie eine Signalkaskade im Zellinneren veranlassen.

Megalin, dem bisher größten Mitglied der LDL Rezeptor Familie sind in letzter Zeit einige Aufgaben zugeschrieben worden, die man allgemein als Aufnahme lipophiler Substanzen im Komplex mit ihren Transportproteinen umschreiben kann. Es handelt sich um das Steroid Vitamin D, gebunden an Vitamin D Bindeprotein (DBP) und um das Retinoid Vitamin A, gebunden an Retinol Bindeprotein, die von Megalin in der Niere in die Zellen des proximalen Tubulus aufgenommen werden (Nykjaer et al. 1999, Christensen et al., 1999a und b).

Das angestrebte Ziel meiner Arbeit war eine weitere Aufklärung, welche Rolle Megalin in der Aufnahme von gebundenen, lipophilen Substanzen wie z. B. Steroiden im Komplex mit Carrierproteinen spielt. Dazu wurden zwei experimentelle Strategien verfolgt.

Begonnen wurde mit der Suche nach weiteren möglichen Liganden. In dieser Arbeit wurden drei Proteine (24p3, Apo D und CCSP) ausgesucht, die jeweils die Funktion eines Transportmoleküls für lipophile Stoffe in einer hydrophilen Umgebung wie Blut oder anderen Körperflüssigkeiten übernehmen.

In diesem Teil meiner Arbeit habe ich versucht, die Hypothese zu untermauern, dass hydrophile Stoffe nicht ausschließlich durch freie Diffusion in die Zelle gelangen, wie von Mendel 1989 vermutet (Mendel, 1989), sondern dass sie mitsamt ihrem Transportmolekül durch Endozytose aufgenommen werden. Die aufgeworfene Hypothese geht davon aus, dass das Transportmolekül selbst der

Teil des Komplexes ist, der vom Endozytoserezeptor erkannt und gebunden wird. Die Identifizierung von Transportmolekülen für lipophile Substanzen, die von Megalin in Gewebe aufgenommen werden, wäre ein weiterer Beweis für die Korrektheit dieser Hypothese.

Durch die Etablierung eines eukaryotischen Expressionssystems im Labor (Hilpert et al., 2001) wurde die Voraussetzung geschaffen, die Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Rezeptoren und potentiellen Liganden zu untersuchen.

Gereinigtes Protein in ausreichender Menge zur Verfügung zu haben, stellte bisher oft ein Problem dar. Die Aufreinigung aus Gewebeextrakten ergibt häufig geringe Ausbeuten an funktionellem Protein. Derweilen birgt diese Methode die Gefahr in sich, dass die oft nicht unerheblichen Mengen an Verunreinigungen die Versuchsergebnisse verfälschen könnten.

Rekombinant hergestellte Proteine, die man aus prokaryotischen Expressionssystemen gewinnt, haben diese Nachteile deutlich reduziert, bergen jedoch andere. In Bakterien hergestellte Eiweiße haben die korrekte Primärstruktur, aber aus Mangel an zelleigenen Hilfsmolekülen, sogenannten Chaperones, weisen die Sekundärstrukturen oftmals Fehler auf. Auch die richtige Zusammenlagerung von mehreren funktionellen Untereinheiten des Proteins, sowie dessen korrekte Modifizierung ist nicht immer gewährleistet. Diese Gegebenheiten führen oftmals dazu, dass trotz richtiger Sequenz und Größe des gereinigten Proteins seine physiologische Aktivität nur sehr begrenzt ist. Aus diesen Gründen entschied ich mich, in zwei Fällen (Apo D und 24p3) die Herstellung selbst in einem eukaryotischen Expressionssystem vorzunehmen. Das dritte von mir untersuchte Protein (CCSP) stammte aus den herkömmlichen Quellen der bakteriellen Produktion und aus einer Körperflüssigkeitsaufreinigung. Das rekombinant hergestellte Protein wurde mir freundlicherweise von Johan Lund aus Lund, Norwegen zur Verfügung gestellt.

Die zweite hier verfolgte experimentelle Strategie zur Aufklärung der Rolle Megalins in der Aufnahme lipophiler Substanzen, ist die Analyse von Megalin exprimierenden Geweben. Der Nachweis möglicher Defekte, die sich mit dem Fehlen lipophiler Substanzen, wie z. B. Steroidhormonen erklären ließe, würden der Expression von Megalin in reproduktiven Organen eine Funktion zuordnen.

In diesem Kontext wurde der Uterus als Megalin exprimierendes Gewebe zur weiteren Analyse gewählt, da Hinweise vorliegen, dass dem Rezeptor eine Rolle bei grundlegenden Entwicklungen des Organs zukommen könnte. So ist bei zirka 60 % der weiblichen, Megalin defizienten Mäuse eine Anomalie der Geschlechtsöffnung zu beobachten, die als Vaginalverschluss beschrieben wird.

4.2. 24p3

24p3 war der erste Kandidat, der als möglicher Ligand für Megalin untersucht wurde. Affimetrix Analysen in denen man die Menge an produzierter mRNA aus Nieren von Megalin defizienten Tieren und Kontrolltieren miteinander verglichen hatte, lieferte die Idee, dass 24p3 möglicherweise mit Megalin interagieren könnte. Es wurde in den Nieren der Knockout Mäuse eine signifikant höhere Menge an 24p3-RNA gemessen. In den drei durchgeführten Parallelansätzen wurden eine 9.2fache, 6.3fache und 2.8fache Menge an 24p3-RNA Menge in der Knockout Maus vorgefunden (Hilpert et al., 2002).

4.2.1. Aufreinigung von 24p3

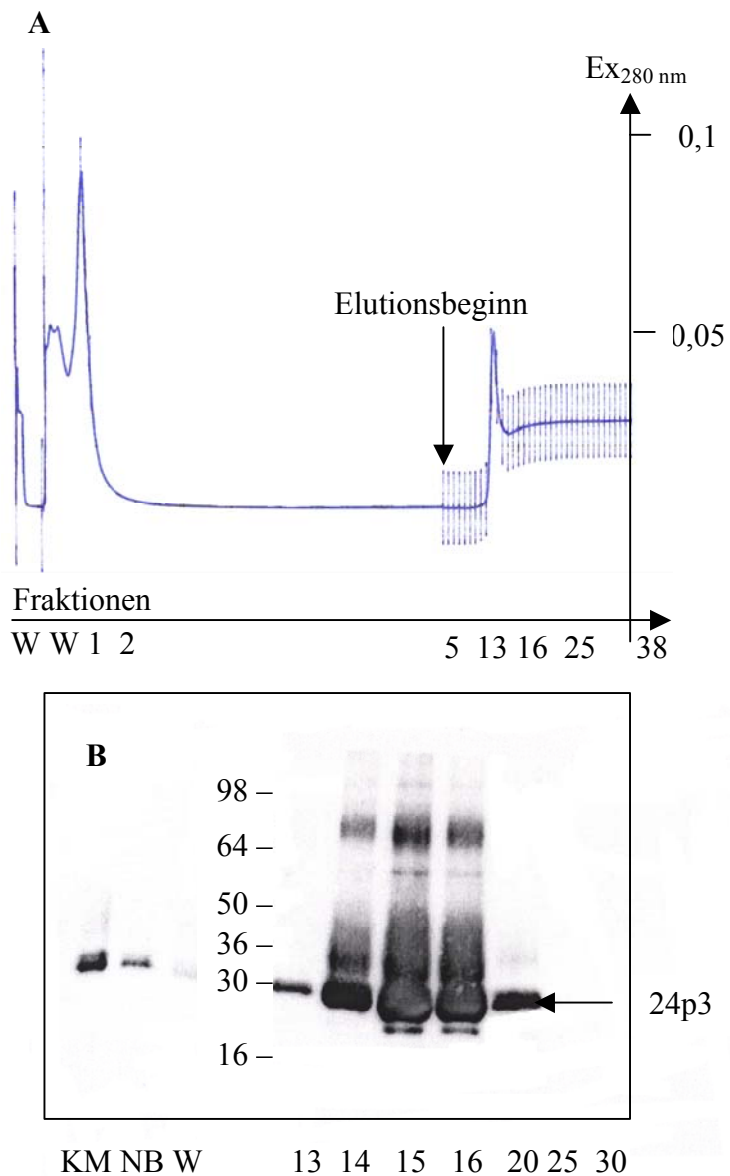
Zur Prüfung, ob es tatsächlich eine direkte Interaktion zwischen dem Endozytoserezeptor Megalin und dem Transportmolekül 24p3 gibt, mussten zunächst ausreichende Mengen an gereinigtem Protein hergestellt werden. Unter Verwendung des eukaryotischen Expressionssystems der 293-EBNA Zellen konnte ich ein Fusionsprotein herstellen, dass zusätzlich zur eigentlichen Aminosäuresequenz am carboxyterminalen Ende ein Myc-Epitop, eine Faktor Xa-Restriktionsstelle und 6 Histidinreste besaß. Durch Affinitätschromatographie reinigte ich 24p3 aus den Zellüberständen von 293-EBNA Zellen, die das Protein produzierten und in das Medium ausschieden, auf. Mit Hilfe der genannten Histidinreste konnte ich das rekombinante Protein an eine Ni-NTA Superflow Säule binden und die Säule mit einem Imidazol-haltigem Puffer eluieren, wobei insgesamt 40 Fraktionen gesammelt wurden. Abb. 4.1. A zeigt das typische Elutionsprofil einer 24p3-Aufreinigung. Dabei wurde die Extinktion bei 280 nm mitgeschrieben (blaue Linie). Die senkrechten Einteilungen geben die gesammelten Fraktionen an.

Abb. 4.1.

24p3 Aufreinigung

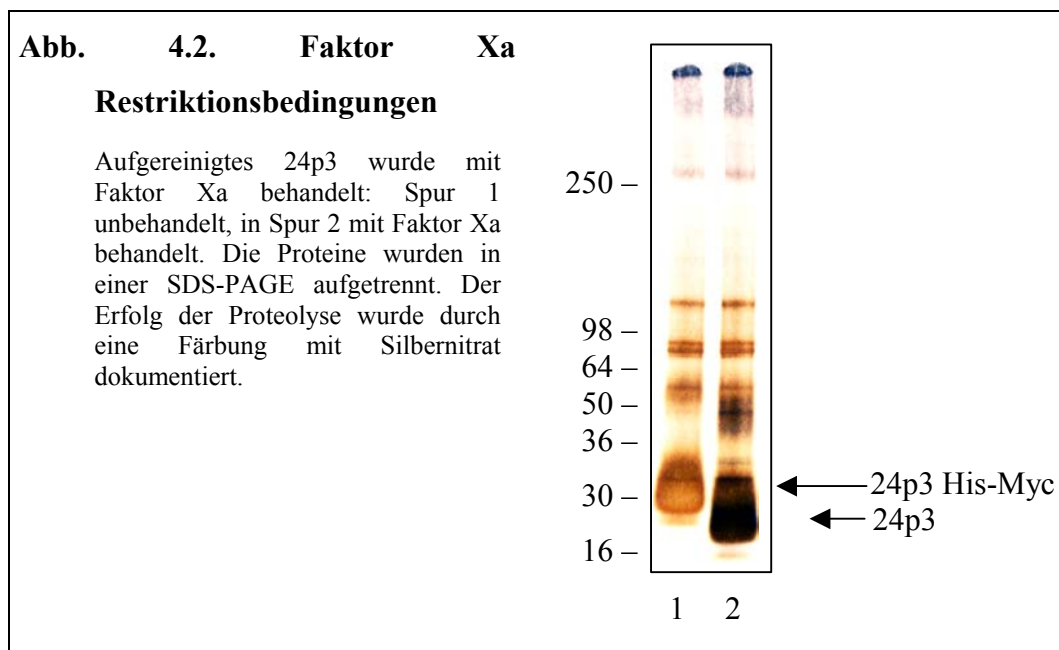
A Konditioniertes Medium von 24p3 produzierenden 293-EBNA Zellen wurde auf eine Ni-NTA Superflow Säule gegeben. Das Waschen und Eluieren der Säule wurde photometrisch überwacht (y-Achse). Gesammelt wurden inklusive der Waschfraktionen 40 Fraktionen. Die Elution erfolgte mit 400 mM Imidazol.

B Es ist die Western-Blot Analyse ausgesuchter Fraktionen abgebildet. Hierzu wurde ein Antikörper genutzt, der den Myc-Bereich des Fusionsproteins detektiert. KM = konditioniertes Medium, NB = Medium nach Bindung auf die Säule, W = Waschfraktion



Im vorderen Bereich des Elutionsprofils sind die Waschfraktionen aufgezeichnet. Es wurden so erhebliche Mengen an im Zellmedium enthaltenem Serum, Farbstoffen und zellulären Abbauprodukten abgetrennt, die sich trotz vorheriger Dialyse im Zellüberstand befanden. Der sich anschließende lange, flache Kurvenverlauf zeigt, dass sich keine weiteren Verunreinigungen mehr von der Säule abwaschen ließen. Startend mit Fraktion 5 wurden die erste 500 µl der eigentlichen Elution gesammelt. Nach Fraktion 38 wurde die Kollektion abgebrochen. Abb. 4.1. **B** zeigt die Western-Blot Analyse ausgewählter

Fraktionen. Sie wurden in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Diese wurde dann mit einem Antikörper, der gegen das Myc-Epitop gerichtet war, inkubiert. Deutlich ist, dass die Fraktionen 15 und 16 die Hauptmenge an Protein enthalten, doch auch in Fraktion 14 sind wesentliche Mengen 24p3 vorhanden. Verglichen mit dem konditionierten Medium (KM in der ersten Spur) ist 24p3 stark angereichert worden. Auch in Medium, das bereits über die Säule gegeben wurde (NB, zweite Spur) ist noch 24p3 nachweisbar, es zeigt, dass die Säule abgesättigt war. Durch die hier beschriebene Methode konnte aus einem Liter konditioniertem Medium 3,6 mg rekombinantes 24p3 gewonnen werden. Da das Myc-Epitop und die Histidinreste nicht mehr benötigt wurden, war der nächste Schritt in der Aufreinigung von 24p3 die enzymatische Abspaltung dieses Anhangs vom Protein. Hierzu wurde die im Fusionsprotein vorhandene Faktor Xa-Proteasestelle genutzt. 24p3 wurde 1:50 (w/w) mit Faktor Xa gemischt und 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Faktor Xa-Inkubation wurde das Enzym/Proteingemisch zwei Stunden auf Eis mit 1 ml des Ni-NTA Superflow Säulenmaterials geschüttelt, um so die abgespaltenen Histidin-Myc-Anhänge aus dem Gemisch zu binden. Entfernt wurden das Säulenmaterial dann mittels Zentrifugation. Jeweils 3,5 µg ungeschnittenes (Abb. 4.2. Spur 1) und geschnittenes 24p3 (Spur 2) wurden in einer 4-12 % SDS-PAGE aufgetrennt und mit Silbernitrat gefärbt.



Nach Abspaltung des Anhangs hat des rekombinant hergestellte 24p3 die beschriebene Größe von 26 kDa, hingegen ist 24p3 mit His-Myc-Anhang 30 kDa groß. Das so hergestellte 24p3 wurde zwecks Antikörperherstellung in ein Kaninchen injiziert.

4.2.2. Immunisierung

Die drei durch Immunisierung (Firma Eurogentec in Herstal, Belgien) gewonnenen Seren wurden durch Western-Blot Analyse überprüft. Es wurden jeweils 1 µg Protein 24p3 mit His-Myc-Anhang (Abb. 4.3. Spur 1-3) aufgetragen, sowie als Kontrollen Apo D mit His-Myc-Anhang (Spur 4) und Apo E R II mit (Spur 5) und ohne His-Myc-Anhang (Spur 6) und in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt, dann auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran wurde in Streifen geschnitten und diese wurden mit den Seren aus drei Blutabnahmen inkubiert.

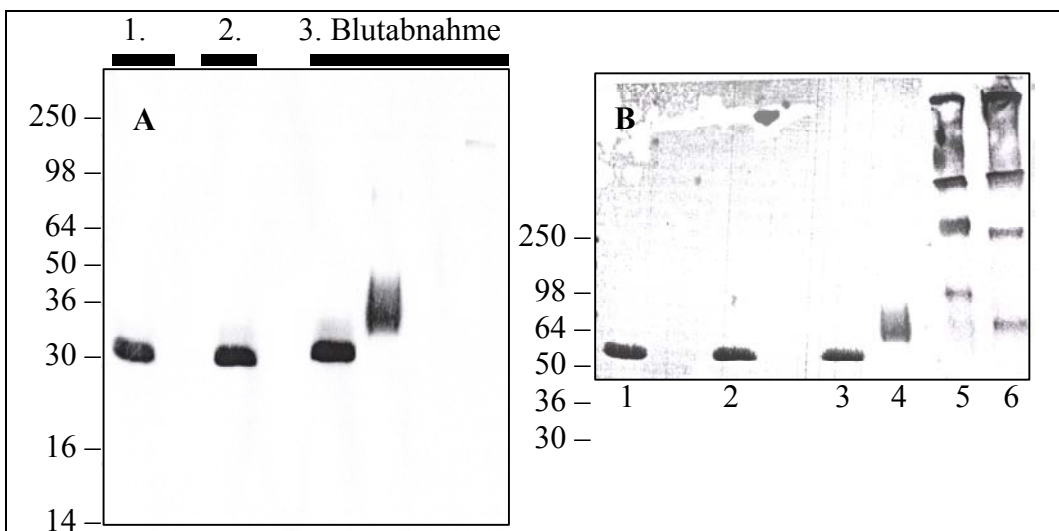


Abb. 4.3. Analyse der drei Blutabnahmen eines Antiserums gegen 24p3

A Jeweils 1 µg Protein (Spur 1, 2 und 3 24p3 mit His-Myc-Anhang, Spur 4 Apo D mit His-Myc-Anhang, Spur 5 Apo E R 2 mit His-Myc-Anhang, Spur 6 Apo E R II ohne His-Myc-Anhang) wurde in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die in Streifen geschnittene Membran wurde mit den Antiseren der drei Blutabnahmen der Immunisierung inkubiert. **B** zeigt als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung die Membran vor der Färbung mit den Antikörpern. Die Proteine sind mit einer Ponceau-Färbung sichtbar gemacht.

Unter der Western-Blot Analyse ist zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung der Spuren die Ponceau-Färbung der Nitrozellulosemembran abgebildet (**B**). Sie zeigt das aufgetrennte Gesamtprotein. Die Überprüfung der Qualität des polyklonalen Antikörpers, der gegen 24p3 gezogen wurde, macht deutlich, dass die drei Blutabnahmen die gleiche Bindungsaktivität besitzen, da 24p3 in den Spuren 1 bis 3 gleich stark gefärbt ist. Jedoch wird von dem Antiserum auch Apo D mit His-Myc-Anhang in Spur 4 erkannt, wobei der Apo D-Anteil des Konstruktes angezeigt wird. Apo D hat drei hochkonservierte Strukturdomänen mit 24p3 gemein. Es kann nicht der His-Myc-Anhang sein, der durch das Antiserum erkannt wird, da das in Spur 5 geladene Apo E R II mit His-Myc-Konstrukt kein Signal gibt.

4.2.3. *BIAcore Analyse der 24p3 - Bindung an Megalin*

Durch BIAcore Analysen wurde untersucht, ob Megalin an 24p3 bindet und so für die zelluläre Aufnahme von 24p3 verantwortlich sein könnte. Für diesen Versuch wurde 24p3 und als Positiv-Kontrolle Rezeptor assoziiertes Protein (RAP) jeweils in einer Konzentration von 1 μ M verwendet. RAP ist ein intrazelluläres Chaperone, das an alle Endozytoserezeptoren der LDL Rezeptor Familie bindet. Es wurde der relative Anstieg von BIAcore Response Units im Vergleich zu einer Kontrollflüssigkeit gemessen und im folgenden Diagramm aufgetragen.

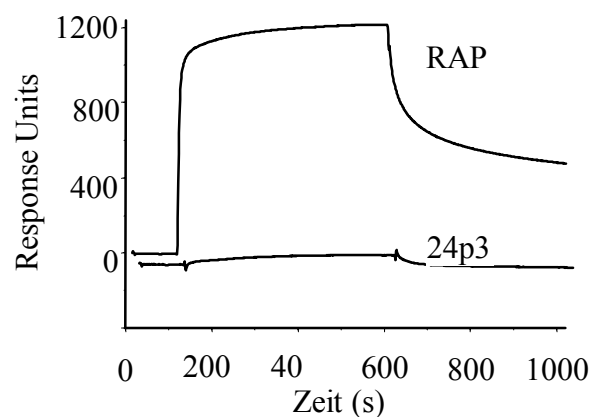


Abb. 4.4. BIAcore Analyse der 24p3-Bindung an Megalin

Immobilisiertes Megalin auf einem BIA Sensor Chip (25 fmol/mm²) wurde mit gereinigtem 24p3 in einer Konzentration von 1 μ M inkubiert. Nach 600 Sekunden wurde begonnen, 24p3 mit Puffer wieder auszuwaschen. Als Kontrolle wurde in einem zweiten Experiment gereinigtes RAP (ebenfalls 1 μ M) über den Megalin-Chip geleitet.

Es konnte eine Bindung von RAP an Megalin, jedoch keine von 24p3 an dem Rezeptor beobachtet werden.

Die obere Kurve von Abb. 4.4. zeigt die Bindung von RAP an Megalin. Knapp 1200 Response Units konnten gemessen werden.

Nach 600 Sekunden erfolgte ein Abfall der Kurve, da zu dem Zeitpunkt RAP aus dem Fließstrom weggelassen wurde. Nur noch Puffer floss über den mit Megalin beschichteten Sensorchip und wusch RAP so wieder aus.

Je spezifischer und stärker die Bindung ist, desto länger benötigt der Puffer, das gebundene Protein vom Sensorchip zu waschen.

Die untere Kurve von Abb. 4.4. zeigt, dass rekombinantes, gereinigtes 24p3 nicht an Megalin bindet, da kein Anstieg der Response Units zu erkennen ist.

Damit wurde die Untersuchung einer möglichen Interaktion zwischen Megalin und 24p3 mit dem Ergebnis eingestellt, dass es wahrscheinlich keine direkte Bindung zwischen den beiden Proteinen gibt.

Die Tatsache, dass vermehrt RNA von 24p3 in den Nieren Megalin defizienter Tiere produziert wird, ist daher wahrscheinlich nicht direkt durch das Fehlen des Rezeptors bedingt. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass es tatsächlich einen indirekten Bezug zwischen 24p3 und Megalin gibt.

Dies sollte jedoch nicht Gegenstand der hier vorgestellten Arbeit sein. Alternativ wäre es möglich, dass das rekombinant in EBNA Zellen produzierte Protein nicht Rezeptor-bindungskompetent und somit biologisch nicht aktiv ist.

4.3. *Apo D*

Das zweite Lipocalin, das als ein möglicher Ligand für Megalin in Frage kam, war Apo D. Apo D wird, außer dass es im Plasma hauptsächlich im Verbund mit high density lipoprotein (HDL-) Partikeln vorkommt (Ayrault-Jarrier et al., 1963), unter anderem auch im Brustdrüsengewebe exprimiert (Cofer et al., 1996).

Die Eigenschaft von Apo D, als Transportmolekül für Progesteron zu dienen (Pearlman et al., 1973), wird in diesem Zusammenhang diskutiert (Rassart et al., 2000).

Auch Megalin wird von Epithelzellen der Brustdrüsenkanäle exprimiert (Lundgren et al., 1997). Eine Funktionsbestimmung in diesem Gewebe ist bis heute nicht erfolgt. Da Megalin bereits als ein Rezeptor beschrieben wurde, der für die zelluläre Aufnahme eines Lipocalins (RBP) verantwortlich ist (Nykjaer et al. 2002), ist es nicht auszuschließen, dass auch im Fall von Apo D die Endozytose durch Megalin vermittelt wird.

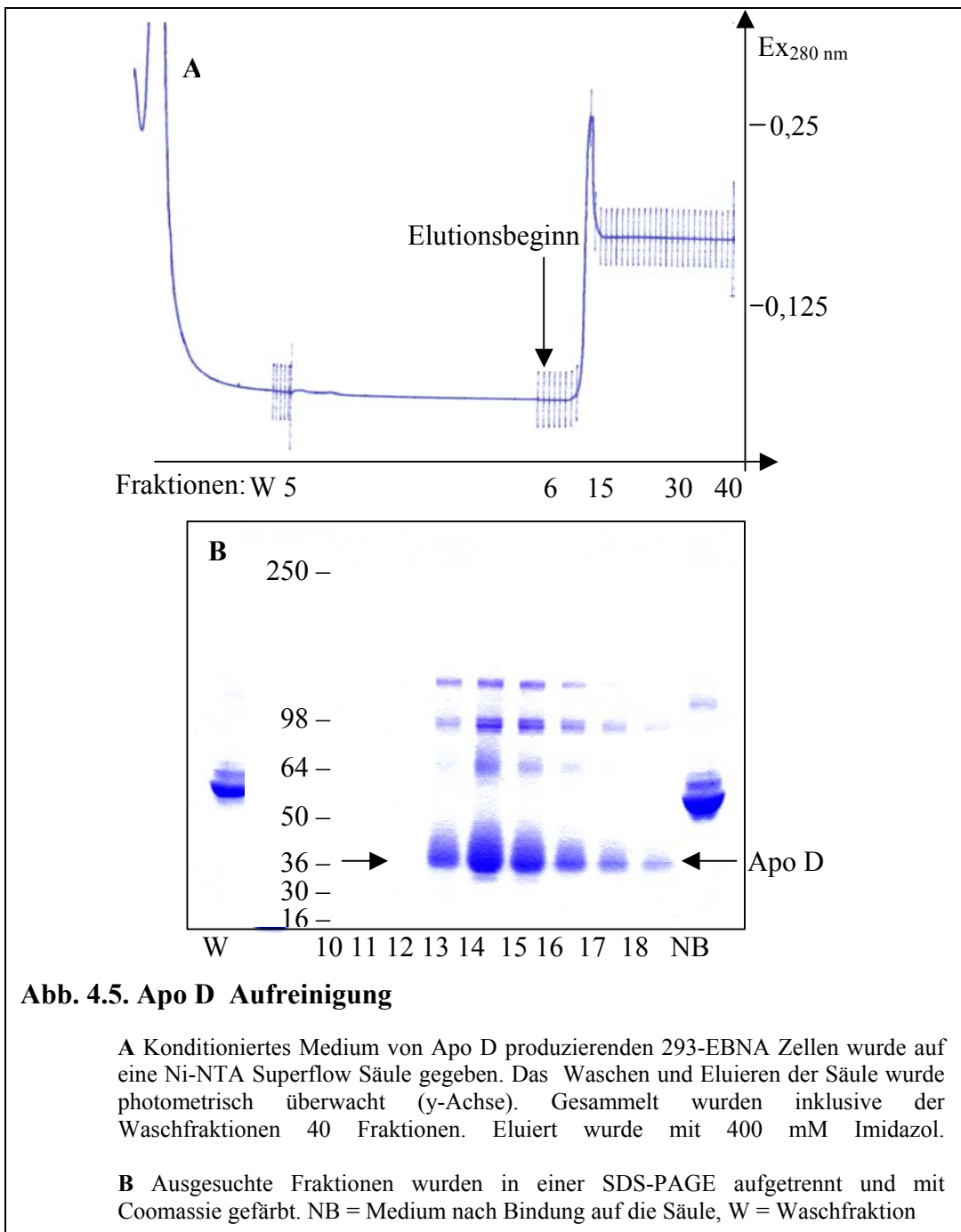
4.3.1. *Aufreinigung von Apo D*

Zunächst galt auch im Fall von Apo D, dass keine ausreichende Mengen an reinem Protein zu Verfügung standen, um eine mögliche Interaktion mit Megalin untersuchen zu können.

Daher habe ich, wie in Abb. 4.3. bereits angedeutet, auch rekombinantes Apo D in dem eukaryotische Expressionssystem der 293-EBNA Zellen produziert. Hierzu wurde als Vorlage für humanes Apo D (RZPD, Berlin, Deutschland) benutzt und die cDNA durch PCR amplifiziert.

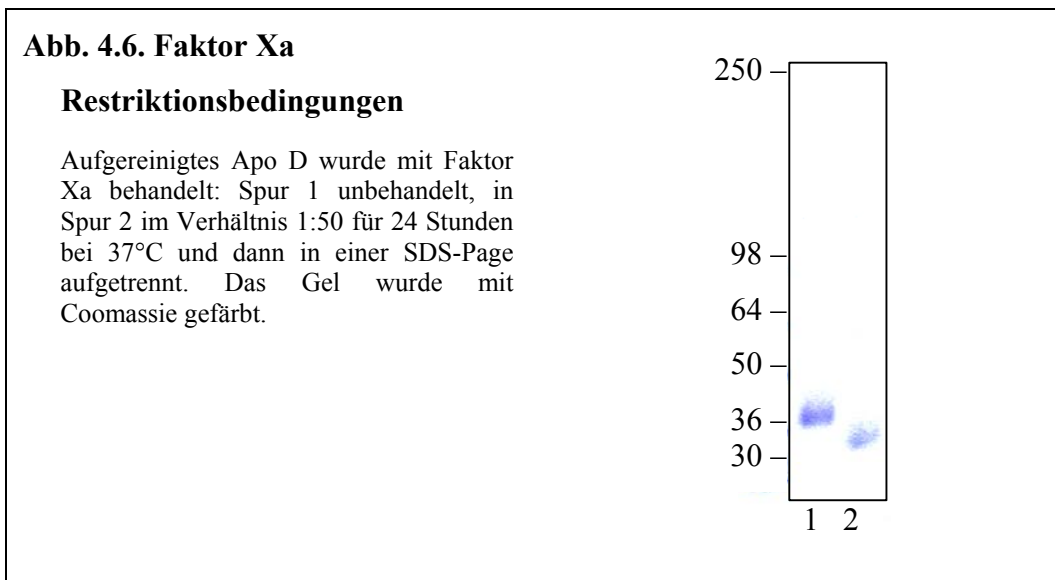
Nach Umklonierung in den Expressionsvektor pCEP-Pu-SP-his-myc-fX wurden 293-EBNA Zellen mit dem Konstrukt mittels Elektroporation transformiert. Das Medium der Zellen wurde abgesaugt und konnte durch Affinitätschromatographie aufgereinigt werden, da das Fusionsprotein zusätzlich zur Aminosäuresequenz von Apo D am carboxyterminalen Ende sechs Histidinreste enthielt. Die Histidinreste banden des rekombinanten Proteins an eine Ni-NTA Superflow Säule und insgesamt 40 Fraktionen wurden mit einem Imidazol-haltigem Puffer von der Säule eluiert.

In Abb. 4.5. ist das Elutionsprofil einer Apo D-Aufreinigung gezeigt.



Nach dem Auswaschen des im Medium enthaltenen Serums und der zellulären Stoffwechselprodukte (W = Waschfraktion) zeigte ein flacher Kurvenverlauf im Elutionsprofil, dass sich keine weiteren Verunreinigungen mehr von der Säule abwaschen ließen. Startend mit Fraktion 5 wurden jeweils 500 µl der Elution

sammelt (Fraktion 5-38). Die sich rechts befindende y-Achse zeigt die jeweils gemessenen optische Dichte bei 280 nm und gibt dabei indirekt die relative Proteinmenge an. Ausgewählte Fraktionen (Abb. 4.5. **B**) wurden in einer 4-12 % SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Gemäß dieser groben Übersicht ist in den Fraktionen 13-15 die Hauptmenge an Protein zu finden, doch auch in Fraktion 15 sind nicht unerhebliche Mengen an Apo D vorhanden. Aus einem Liter konditioniertem Medium konnte ich mittels dieser Methode 3,8 mg rekombinantes Apo D gewinnen. Da für eine Immunisierung eines Kaninchens und zur generellen Weiterverwendung des Proteins der Myc-Epitop- und Histidin-Anhang störend wäre, wurde dieser durch eine enzymatische Abspaltung mit Faktor Xa entfernt. Hierzu wurde Apo D mit Faktor Xa gemischt und 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Das Faktor Xa / Apo D-Gemisch wurde zwei Stunden auf Eis mit 1 ml des Ni-NTA Superflow Säulenmaterials geschüttelt, um so die abgespaltenen Histidin-Myc-Anhänge zu binden. Mit einer Zentrifugation wurden Säulenmaterial und gebundene His-Myc-Anhänge entfernt. Jeweils 4 µg ungeschnittenes (Abb. 4.6. Spur 1) und geschnittenes Apo D (Spur 2) wurden in einer 4-12 % SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt.



Das in Spur 2 der Abb. 4.6. dargestellte Apo D hat ohne den für die Aufreinigung nötigen Anhang die in der Literatur beschriebene Größe von 30 kDa (Goessling et al., 2000). Apo D mit His-Myc-Anhang hingegen ist gut 36 kDa groß. Das so hergestellte Apo D wurde zur Antikörperherstellung in ein Kaninchen injiziert.

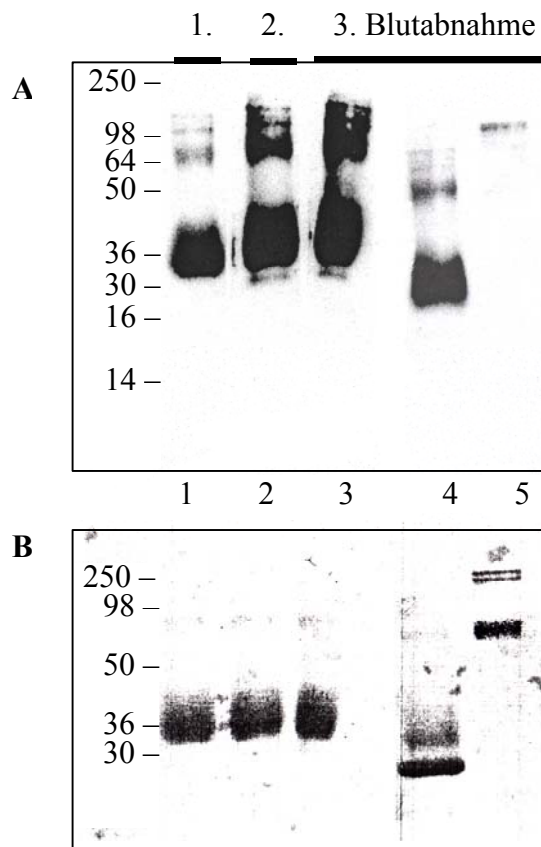
4.3.2. Immunisierung

Die Immunisierung des Kaninchens wurde wieder von der Firma Eurogentec vorgenommen. Die aus den drei erhaltenen Blutabnahmen gewonnenen Seren wurden durch Western-Blot Analyse überprüft. Es wurden jeweils 4 µg Protein Apo D mit His-Myc-Anhang (Abb. 4.7. Spur 1-3) aufgetragen, sowie als Kontrollen 24p3 mit His-Myc-Anhang (Spur 4) und Apo E R 2 mit His-Myc-Anhang (Spur 5) und in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt, danach auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran wurde in Streifen geschnitten und diese wurden mit den drei Blutabnahmen inkubiert.

Abb. 4.7. Gewinnung eines polyklonalen Antikörpers gegen Apo D

A Je 4 µg Protein (Spur 1, 2 und 3 Apo D mit His-Myc-Anhang, Spur 4 24p3 mit His-Myc-Anhang, Spur 5 Apo E R 2 mit His-Myc-Anhang) wurden in einer SDS-Page aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die in Streifen geschnittene Membran wurde mit den Antiseren der drei Blutabnahmen der Immunisierung inkubiert.

B Die Proteine auf der Nitrozellulosemembran sind vor der Antikörperfärbung mit einer Ponceau-Färbung sichtbar gemacht worden. Dieses diente zur Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung.



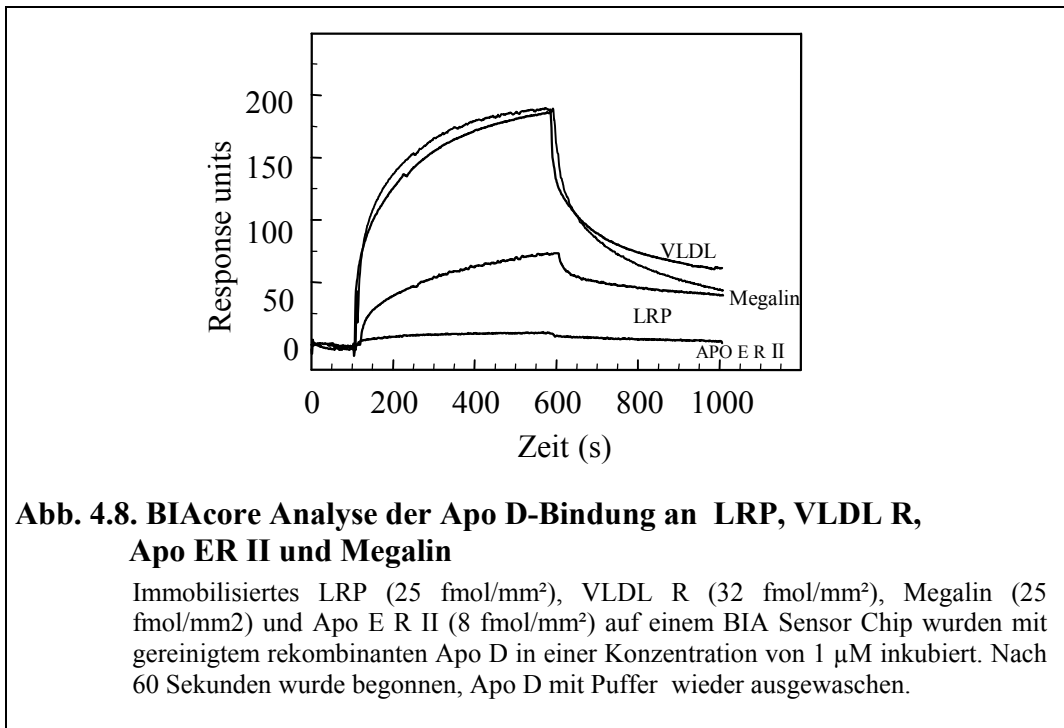
Im Teil B der Abb. 4.7. ist die Ponceau-Färbung der Nitrozellulosemembran gezeigt. Sie zeigt das aufgetrennte Gesamtprotein, bevor die Membran mit den Antiseren gefärbt wurde. Es ist zu vermerken, dass diese Art von Färbung wenig sensibel ist und nur grob als Beladungskontrolle dienen kann. In den ersten drei Spuren der Membran wurden jeweils Apo D mit His-Myc-Anhang geladen und

man erkennt, dass mit Fortdauer der Immunisierung die Stärke des Signals steigt. Unerfreulicherweise wird nicht nur Apo D im Molekulargewichtsbereich von 36 kDa detektiert, sondern zusätzlich sind zahlreiche Banden im Bereich von 80 bis weit über 150 kDa erkennbar. Ob es sich um Rückstände des Serums handelt, das nicht durch die Aufreinigung entfernt werden konnte, oder um Aggregate von Apo D lässt sich durch diesen Versuch nicht sagen. Erstaunlicherweise gibt die Ponceau-Färbung der Nitrozellulosemembran keinen Hinweis darauf, dass im Western-Blot solche starken Signale in dem Molekulargewichtsbereich zu erwarten wären. Auch das Antiserum gegen Apo D zeigt Kreuzreaktionen mit 24p3 mit His-Myc-Anhang in Spur 4, also dem zweiten auf dem Blot vertretenen Lipocalin. Wie in Absatz 4.2.2. angeführt, haben Apo D und 24p3 drei hochkonservierte Strukturdomänen gemein. Wie das Antiserum gegen 24p3 detektiert auch das gegen Apo D beide Vertreter der Lipocalin-Familie. Es muss also festgestellt werden, dass die Qualität des Antikörpers mangelhaft ist. Es ist in diesem Falle jedoch nicht ganz ausgeschlossen, dass auch der His-Myc-Anhang etwas zu dem erhaltenen Signal beiträgt, also durch das Antiserum erkannt wird, da Apo E R 2 mit His-Myc-Anhang (Abb. 4.7. Spur 5) ebenfalls ein schwaches Signal gibt. Dem Anschein nach ließ sich in diesem Versuchsansatz der His-Myc-Anhang des Proteins nicht komplett von allen Molekülen abspalten und/oder nicht gänzlich aus ihm entfernen, nachdem er abgespalten wurde. Da es sich bei dem Antiserum gegen Apo D um ein polyklonalen Antikörper handelt und ein Myc-Epitop offensichtlich sehr immunogene Eigenschaften besitzt, werden von dem hier dargestellten Antiserum außer den Lipocalinen gemeinsamen Strukturen zusätzlich das Myc-Epitop erkannt.

4.3.3. BIAcore Analyse der Apo D - Bindung an vier LDL R Familienmitglieder

Um zu testen, ob Megalin für die zelluläre Aufnahme von Apo D verantwortlich sein könnte, wurde durch BIAcore Analysen untersucht, ob Apo D an Megalin bindet. Zusätzlich wurden auch weitere Rezeptoren der LDL R Gen Familie, nämlich Apo E R 2, LRP und VLDL R auf ihr Bindungsverhalten Apo D gegenüber untersucht.

Für diese Versuche wurde jeweils 1 μM gereinigtes Apo D verwendet. Es wurde der relative Anstieg von BIAcore Response Units im Vergleich zu einer Kontrollflüssigkeit ohne Apo D gemessen und im folgenden Diagramm aufgetragen.



Es konnte eine Bindung von Apo D sowohl an Megalin und als auch an den VLDL R beobachtet werden (die beiden oberen Kurven in Abb. 4.8.).

Die oberste Kurve zeigt die Bindung von Apo D an VLDL R. Knapp 20 Response Units konnten gemessen werden. Sehr ähnlich sieht die Kurve und damit das Bindungsverhalten von Apo D an Megalin aus (zweiter Kurvenverlauf von oben). Der Abfall der Kurve erfolgte nach 60 Sekunden, da zu dem Zeitpunkt aus dem Fließstrom das Apo D weggelassen wurde und nur noch Puffer über den mit dem angegebenen Rezeptor beschichteten Sensorchip floss und so Apo D wieder auswusch.

Die unteren beiden Kurven zeigen, dass Apo D nur sehr schwach an LRP, jedoch gar nicht an Apo E R II bindet, da im Fall von LRP nur ein minimaler Anstieg der Kurve zu erkennen ist, und im Fall von Apo E R 2 gar keiner.

Es bleibt festzustellen, dass das von mir rekombinant hergestellte Apo D relativ gut an Megalin und VLDL R bindet, an LRP nur mit sehr geringer Affinität und an Apo E R II überhaupt nicht.

4.3.4. Apo D - Aufnahme und Degradation durch BN 16 Zellen

Bisher konnte die Bindung von Apo D an Megalin und an VLDL R gezeigt werden, beides Vertreter der LDL Rezeptor Gen Familie.

In den folgenden Experimenten wurde ausschließlich die mögliche Interaktion zwischen Apo D und Megalin untersucht. Auf eine abschließende Antwort, ob VLDLR für eine zelluläre Aufnahme von Apo D verantwortlich ist, musste leider aufgrund eines fehlenden Zellmodells (Zellen mit VLDL R-Expression) an dieser Stelle verzichtet werden.

Sowohl Megalin als auch Apo D sind in Brustdrüsengewebe zu finden. Megalin kleidet die Epithelien aus und Apo D wird in Sekreten und in Flüssigkeiten von Brustzysten gefunden. Die Frage ist nun, ob es auch zu einer Interaktion zwischen den beiden Proteinen in vivo kommt.

Um diese Situation in vitro zu simulieren, verwendete ich als Zellmodell Karzinomazellen des Dottersacks von Brown Norway Ratten (BN 16), da diese BN 16 Zellen Megalin exprimieren (Le Panse et al., 1997a).

Mit Hilfe der Liganden Blot Analyse wurde getestet, ob der Membranextrakt von BN 16 Zellen in der Lage ist, rekombinantes ¹²⁵J-Apo D zu binden. Als Kontrollzellen wurden HeLa-Zellen verwendet, eine Tumorzelllinie, die kein Megalin exprimiert.

Vorab wurde rekombinantes Apo D mit ¹²⁵Jod radioaktiv markiert. Es besaß eine spezifische Aktivität von 14243 cpm/ng.

Als Kontrolle wurde auch RAP radioaktiv markiert. Wie unter 4.2.3. beschrieben, ist RAP ein Protein, das mit hoher Affinität zu Megalin bindet. Es besaß eine spezifische Aktivität von 25276 cpm/ng. Es wurden 5 (Abb. 4.9. Spur 1) und 10 µg (Spur 2) der BN 16 Zellmembranen und 10 µg der HeLa-Zellmembranen (Spur 3) in einer nicht reduzierenden 4-12 % SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert.

Die Membran wurde in zwei Teile geschnitten und der Teil mit Spur 1 mit rekombinantem ^{125}J -RAP, der Teil mit Spur 2 und 3 mit rekombinantem ^{125}J -Apo D inkubiert. Gebundene Proteine wurden durch einen Phosphoimager (Fujix Bas 2000) sichtbar gemacht.

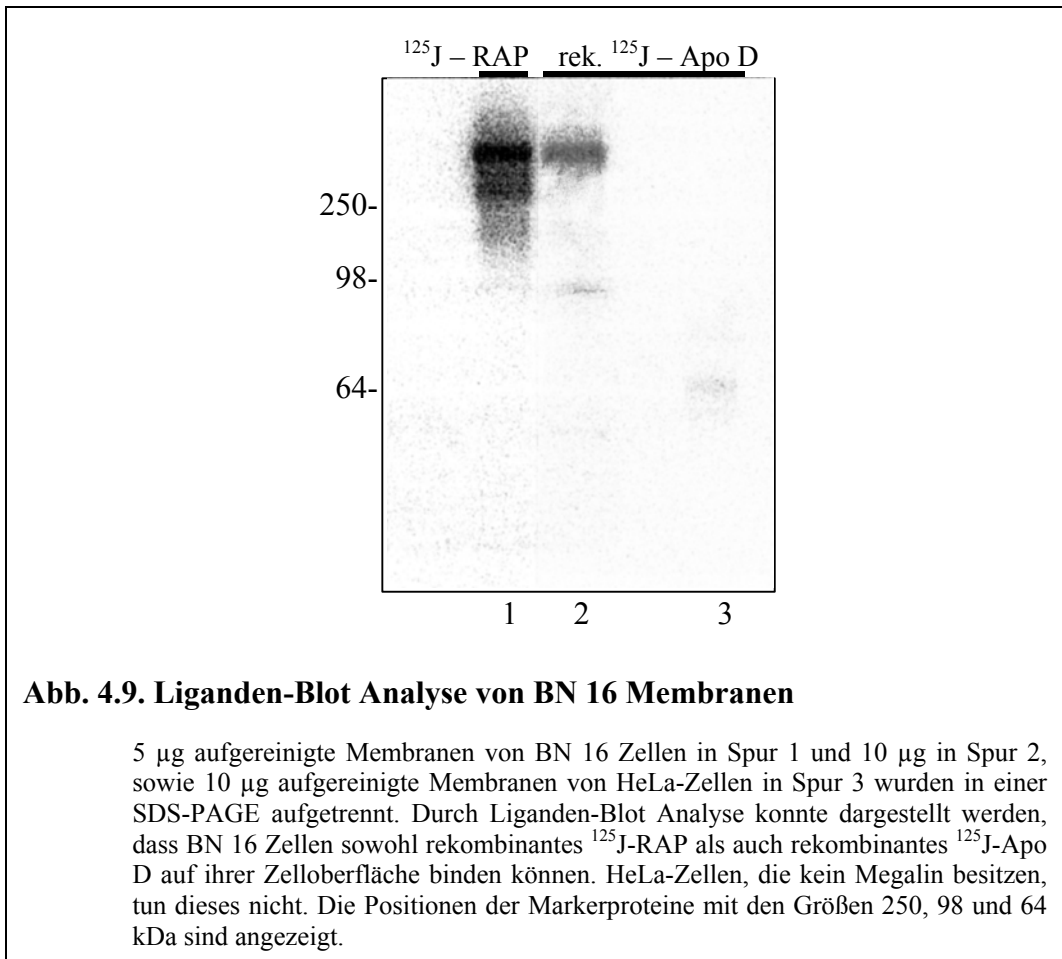


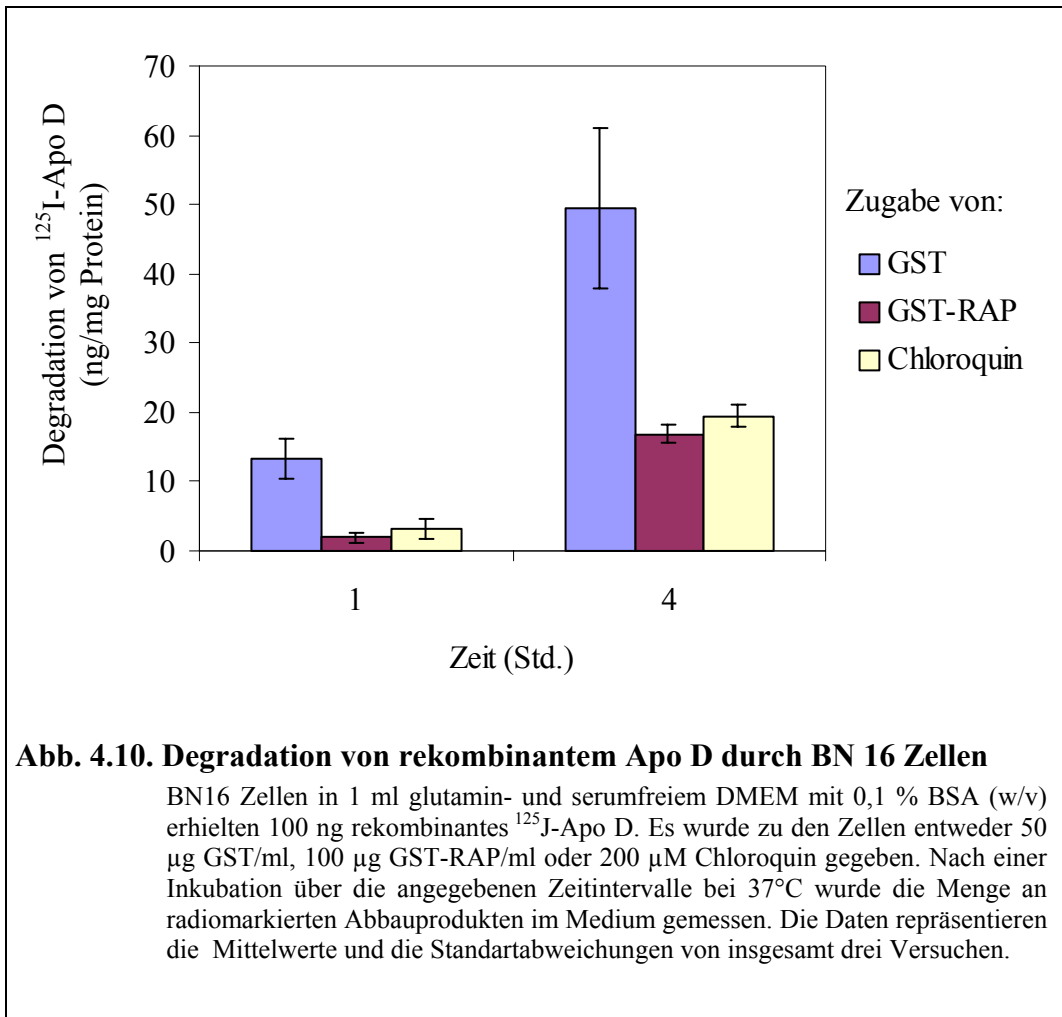
Abb. 4.9. Liganden-Blot Analyse von BN 16 Membranen

5 μg aufgereinigte Membranen von BN 16 Zellen in Spur 1 und 10 μg in Spur 2, sowie 10 μg aufgereinigte Membranen von HeLa-Zellen in Spur 3 wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Durch Liganden-Blot Analyse konnte dargestellt werden, dass BN 16 Zellen sowohl rekombinantes ^{125}J -RAP als auch rekombinantes ^{125}J -Apo D auf ihrer Zelloberfläche binden können. HeLa-Zellen, die kein Megalin besitzen, tun dieses nicht. Die Positionen der Markerproteine mit den Größen 250, 98 und 64 kDa sind angezeigt.

Wie in Abb. 4.9. zu sehen, konnten BN 16 Zellen rekombinantes ^{125}J -Apo D binden. Der bindende Rezeptor ist mit höchster Wahrscheinlichkeit Megalin, da RAP im selben Molekulargewichtsbereich gebunden wird. Ob es zu einer zeitabhängigen Aufnahme und einem darauf folgenden lysosmalen Abbau des Proteins kommt, sollte durch Aufnahme- und Degradationsstudien aufgeklärt werden.

BN 16 Zellen in 1 ml glutaminfreiem DMEM mit 0,1 % (w/v) BSA erhielten 100 ng des rekombinanten ^{125}J -Apo D pro ml Medium. Zusätzlich enthielt das Medium entweder 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Glutathion S-Transferase-RAP Fusionsprotein (GST-RAP), 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Glutathion S-Transferase (GST) oder 200 μM Chloroquin,

einen Inhibitor des lysosomalen Abbaus. Nach einer Inkubation bei 37°C wurde im Abstand von einer und von vier Stunde die Menge an radioaktiven Abbauprodukten, welche in das Medium ausgeschieden wurde, gemessen (Abb. 4.10.).



Nach einer Stunde wurden 13,4 ng und nach vier Stunden 49,5 ng ¹²⁵J-Apo D pro mg BN 16 Zellen in die Zellen aufgenommen und degradiert. Diese Werte wurden ohne Zugabe von Inhibitoren gemessen.

Die Zugabe von GST diente der Verifizierung, dass der blockierende Teil des GST-RAP Fusionsproteins das RAP war. Die Zugabe von GST-RAP zum Assay reduziert deutlich die Aufnahme und den Abbau von Apo D.

Nach einer Stunde verringerte RAP die Apo D Aufnahme auf 16,6 %, nach vier Stunden wurden im Vergleich zu der ungehinderten Aufnahme 34 % degradiertes ¹²⁵J-Apo D im Zellüberstand vorgefunden.

Auch mit Zugabe von Chloroquin, einem Inhibitor lysosomaler Degradation, konnte die Degradation von ^{125}J -Apo D durch BN 16 Zellen vermindert werden. Betonen möchte ich, dass Chloroquin nicht die Endozytose, also die Aufnahme des Proteins in die Zellen unterbindet, jedoch den Abbau desselbigen. Nach einer Stunde konnten 26,4 % und nach vier Stunden 22,3 % des Normalwertes gemessen werden.

Es kann zusammenfassend gesagt werden, dass Apo D von BN 16 Zellen aufgenommen und degradiert wird, und dass sowohl RAP, als auch Chloroquin die Aufnahme und Degradation von Apo D deutlich reduzieren.

Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese Aufnahme und Degradation von Megalin vermittelt wird, da Megalin das einzige Apo D bindende Protein in BN 16 Zellen ist, das durch RAP inhibiert wird.

4.3.5. *Apo D - Progesteron*

Grundsätzlich lässt sich feststellen, dass die zelluläre Aufnahme von Apo D und der darauf folgende Abbau des Proteins durch Megalin vermittelt wird. Die Frage, warum Megalin Apo D in die Zellen aufnimmt ist jedoch nicht beantwortet. Im Fall eines hormonabhängigen Gewebes wie der Brust ist es von Interesse, wie die Steroide in die Zellen gelangen. Daher sollte im folgenden Versuch untersucht werden, ob Apo D in seiner Eigenschaft als Progesteron-Transportmolekül aufgenommen wird.

Zunächst einmal wurde H^3 -Progesteron mit dem von mir rekombinant hergestellten Apo D komplexiert. Der entstandene Komplex besaß eine spezifische Aktivität von 11,8 cpm/ng Apo D. BN 16 Zellen in 0,32 ml glutaminfreiem DMEM mit 0,2 % (w/v) BSA erhielten 55,6 μg des rekombinanten Apo D/ H^3 -Progesteron-Komplexes pro ml Medium. Zusätzlich enthielt das Medium entweder 100 $\mu\text{g/ml}$ Glutathion S-Transferase-RAP Fusionsprotein (GST-RAP) oder 50 $\mu\text{g/ml}$ Glutathion S-Transferase (GST). Nach einer Inkubation bei 37°C wurde nach einer, zwei und vier Stunden die Menge an radioaktivem Progesteron, welches in die Zellen aufgenommen wurde, gemessen.

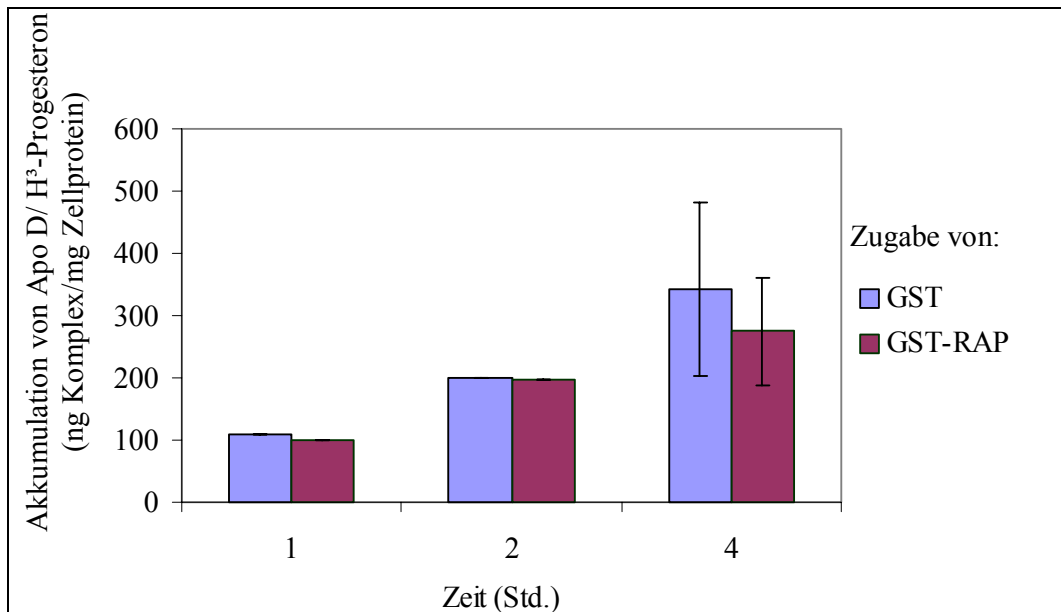


Abb. 4.11. Akkumulation von rekombinantem Apo D im Komplex mit H³-Progesteron durch BN 16 Zellen

BN16 Zellen in 0,32 ml glutamin- und serumfreiem DMEM mit 0,2 % BSA (w/v) erhielten 55,6 µg rekombinantes Apo D/H³ - Progesteron. Es wurde zu den Zellen entweder 100 µg GST-RAP / ml oder 50 µg GST/ml. Nach einer Inkubation über die angegebenen Zeitintervalle bei 37°C wurde die Menge an radiomarkiertem Progesteron in den Zellen gemessen.

Ohne die Zugabe von RAP als Inhibitor konnte in der Tat eine zeitabhängige Akkumulation von Progesteron in den BN 16 Zellen gemessen werden (Abb.4.11.). Durchschnittlich 343 ng des Komplexes wurden binnen vier Stunden in die Zellen aufgenommen. Wie bereits in Absatz 4.3.4. beschrieben, diente die Zugabe von GST der Kontrolle, dass der GST-Anteil im GST-RAP Fusionsproteins nicht der blockierende Teil war. Jedoch reduziert die Zugabe von GST-RAP zum Assay nicht die Aufnahme und Akkumulation von Progesteron. Es kann zusammenfassend gesagt werden, dass sich Progesteron in BN 16 Zellen zeitabhängig ansammelt. Jedoch kann nicht von einer rezeptorvermittelten Aufnahme gesprochen werden, wenigstens nicht, was Megalin betrifft. Wäre Megalin an der Endozytose von Progesteron im Komplex mit Apo D beteiligt, ließe sich die Aufnahme durch eine Zugabe von RAP hemmen. Dieses konnte nur für Apo D ohne Progesteron gezeigt werden.

4.4. CCSP BIAcore Analysen

Dieser Teil der Arbeit diente der Untersuchung, ob Megalin der Rezeptor ist, welcher das Trägerprotein CCSP bzw. CCSP im Komplex mit einem Liganden durch Endozytose in Gewebe aufnimmt.

Dafür wurde das Hauptaugenmerk auf den proximalen Tubulus der Niere gerichtet, da von diesem Gewebe bekannt ist, dass es für Wiederaufnahme von CCSP und CCSP/PCB aus dem glomerulären Filtrat verantwortlich ist (Stripp et al., 1996).

Von Megalin sind bereits mehrere Funktionen in der Niere bekannt. Megalin ist für die Rückgewinnung von bestimmten Vitaminen im Komplex mit ihren Trägerproteinen aus dem glomerulären Filtrat verantwortlich. Zu diesen Komplexen gehören 25-OH Vitamin D₃/Vitamin D-bindendes Protein, Vitamin A/Retinol-bindendes Protein und Vitamin B₁₂/Transcobalamin (Nykjaer et al., 1999, Christensen et al., 1999, Moestrup et al., 1998).

Neben Megalin ist allerdings auch ein zweiter Endozytoserezeptor im Epithelium des proximalen Tubulus der Niere beschrieben worden (zusammengefasst von Christensen et al., 1998). Dieser zweite Rezeptor heißt Cubilin, es ist ein peripheres Membranprotein. Von Cubilin ist bekannt, dass es in der Resorption von Albumin involviert ist (Birn et al., 2000a). Ich habe also im Folgenden beide Endozytoserezeptoren parallel untersucht.

4.4.1. CCSP - Bindung an Cubilin und Megalin

Um zu testen, ob einer der beiden Rezeptoren ebenso für die tubuläre Aufnahme von CCSP verantwortlich sein könnte, wurde durch BIAcore Analysen untersucht, ob CCSP an Cubilin oder Megalin bindet.

Für diese Versuche wurde jeweils gereinigtes CCSP aus einer Spülung der Lungen mit steriler Kochsalzlösung (Lavage) der Ratte in einer Konzentration von 1 µM verwendet. Es wurde der relative Anstieg von BIAcore Response Units im Vergleich zu einer Kontrollflüssigkeit gemessen und im folgenden Diagramm aufgetragen (Abb. 4.12.).

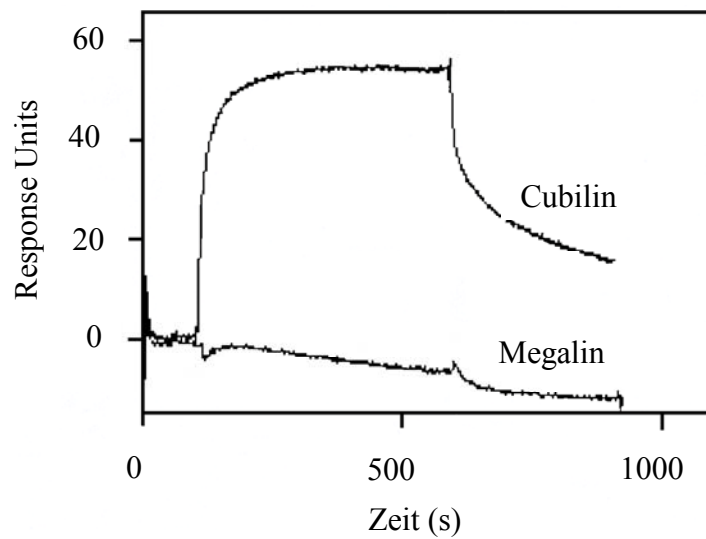


Abb. 4.12. BIAcore Analyse der CCSP - Bindung an Cubilin und Megalin

Immobilisiertes Megalin (25 fmol / mm²) und Cubilin (40 fmol / mm²) auf einem BIA Sensor Chip wurden mit gereinigtem CCSP aus einer Lungen-Lavage der Ratte in einer Konzentration von 1 µM inkubiert. Nach 600 Sekunden wurde begonnen, CCSP mit Puffer wieder auszuwaschen.

Es konnte eine Bindung von CCSP an Cubilin, jedoch keine an Megalin beobachtet werden.

Die obere Kurve zeigt die Bindung von CCSP an Cubilin. Knapp 60 Response Units konnten gemessen werden.

Der Abfall der Kurve erfolgte nach 600 Sekunden, da zu dem Zeitpunkt aus dem Fließstrom das CCSP weggelassen wurde und nur noch Puffer über den mit Cubilin beschichteten Sensorchip floss und so CCSP wieder auswusch.

Die untere Kurve zeigt, dass CCSP nicht an Megalin bindet, da kein Anstieg zu erkennen ist.

4.4.2. Bindungsaffinität von CCSP an Cubilin

Da CCSP offenbar an Cubilin bindet, sollte die Bindungsstärke zwischen CCSP und Cubilin quantifiziert werden. Für die Berechnung des K_d-Wertes wurden verschiedene Konzentrationen von CCSP aus der Lungen-Lavage einer Ratte über immobilisiertes Cubilin geleitet.

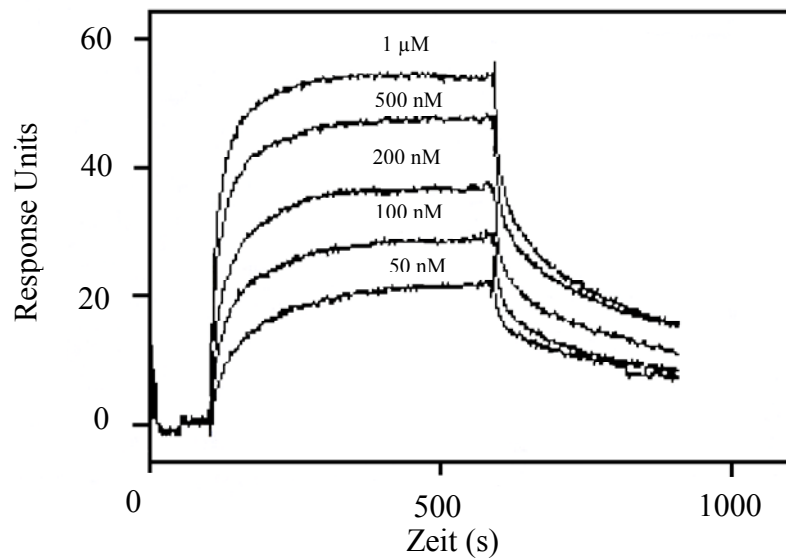


Abb. 4.13. Kalkulation der Bindungsaffinität von CCSP an Cubilin

Immobilisiertes Cubilin (40 fmol/mm^2) auf einem BIA Sensor Chip wurden mit gereinigtem CCSP aus einer Lungen-Lavage der Ratte in einer Konzentration von $1 \text{ }\mu\text{M}$, 500 nM , 200 nM , 100 nM und 50 nM inkubiert. Nach 600 Sekunden wurde begonnen, CCSP mit Puffer wieder auszuwaschen. Aus den kinetischen Parametern wurde ein K_d -Wert von 56 nM errechnet.

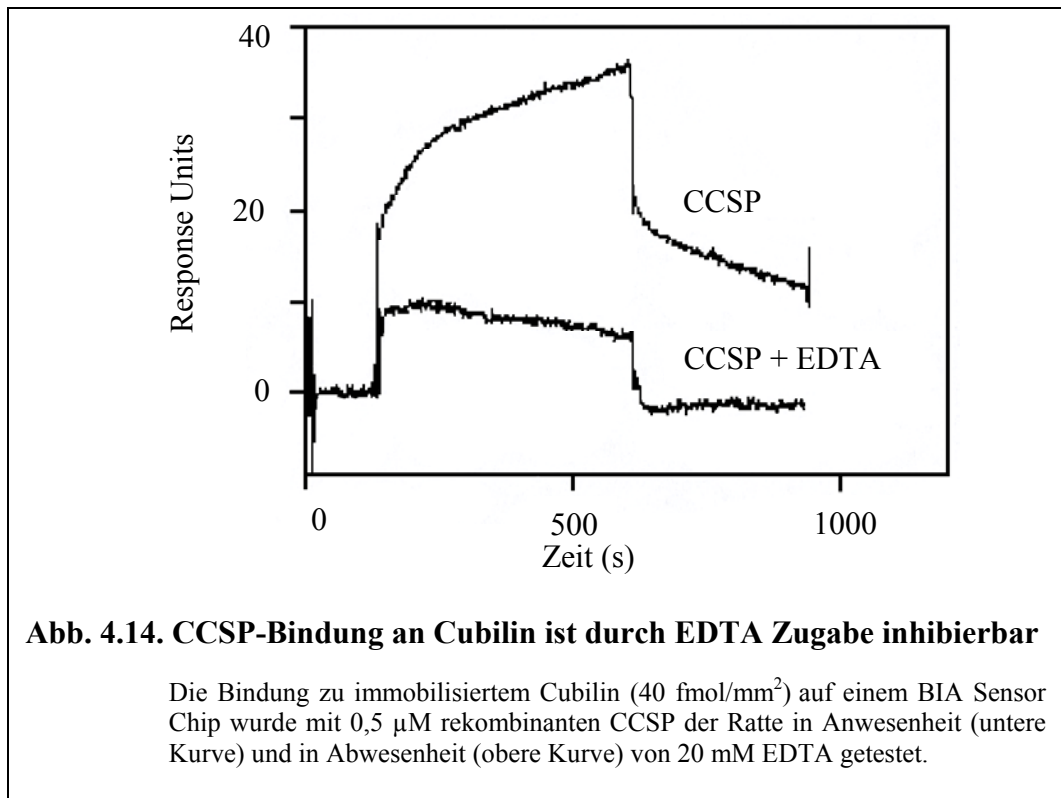
Erwartungsgemäß zeigte sich mit steigender CCSP-Konzentration in dem Fließstrom ein Anstieg der Response Units (Abb.4.13.).

Aus den kinetischen Parametern konnte mit Hilfe der BIAevaluation 3.0-Software ein K_d -Wert von 56 nM für die Bindung von CCSP aus der Lavage einer Ratte an Cubilin errechnet werden. Ersetzte man dieses natürliche Protein durch rekombinantes Ratten-CCSP wurde eine geringfügig kleinere Affinität von 400 nM gemessen. Diese Daten sind hier nicht gezeigt.

4.4.3. CCSP Bindung an Cubilin in Abhängigkeit von Kalzium und Magnesium

Um die Bindung von CCSP an Cubilin noch detaillierter beschreiben zu können, wurde EDTA, ein Chelatbildner für Kalziumionen in den Bindungspuffer und somit in den Versuchsablauf zugegeben.

Es wurden jeweils $0,5 \text{ }\mu\text{M}$ rekombinantes Ratten-CCSP in Anwesenheit (Abb. 4.14., unteren Kurve) oder Abwesenheit von 20 mM EDTA (Abb. 4.13., oberer Kurvenverlauf) über den Cubilin beschichteten Sensorchip geleitet.



Ohne Zugabe von EDTA wurde ein normaler Kurvenverlauf und damit eine ungehinderte Bindung von CCSP an Cubilin beobachtet (obere Kurve). Die deutlich flachere, untere Kurve bei Zugabe des Kalziumionen bindenden Chelatbildners EDTA zeigt, dass die Bindung von CCSP an Cubilin abhängig von der Anwesenheit von Kalziumionen ist. Ohne Kalziumionen ist nur eine geringe Bindung messbar.

4.4.4. Inhibierung der CCSP Bindung zu Cubilin durch RAP

Des Weiteren wurde getestet, welche Konsequenzen die Zugabe von RAP zu dem Bindungsversuch hat. RAP ist ein zelluläres Chaperone, das nicht nur, wie bereits erwähnt, an alle Mitglieder der LDL R Gen Familie, sondern auch Cubilin bindet. Gibt man rekombinantes RAP *in vitro* zu Cubilin, kann man die Bindung von Liganden an den Rezeptor verhindern (Kristiansen et al., 1999). Ob dieses auch für CCSP gilt, sollte im folgenden Versuch in Erfahrung gebracht werden. Hierzu wurde Cubilin mit 10 µM RAP vorinkubiert und die resultierenden Response Units wurden gemessen. Nach 700 Sekunden wurde in den Fließstrom zusätzlich 10 µM RAP oder 0,5 µM rekombinantes Ratten-CCSP injiziert.

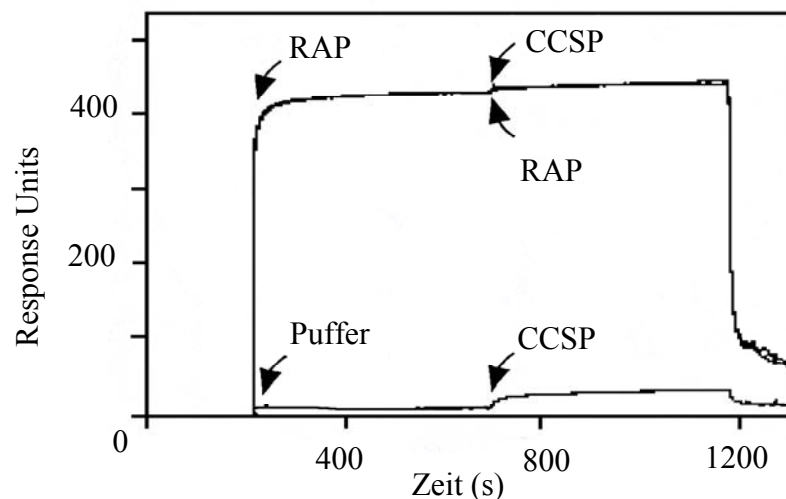


Abb. 4.15. CCSP-Bindung an Cubilin ist durch RAP blockierbar

Cubilin auf dem BIA Sensor Chip (40 fmol/mm^2) wurde mit $10 \mu\text{M}$ RAP vorinkubiert. Über diesen Komplex wurde dann eine Lösung mit $0,5 \mu\text{M}$ rekombinanten CCSP oder $10 \mu\text{M}$ RAP geleitet. Weder RAP noch CCSP verursachten einen weiteren Anstieg der Response Units (oberer Kurvenverlauf). Der untere Kurvenverlauf beschreibt das Bindungsverhalten von CCSP ohne Vorinkubation mit RAP.

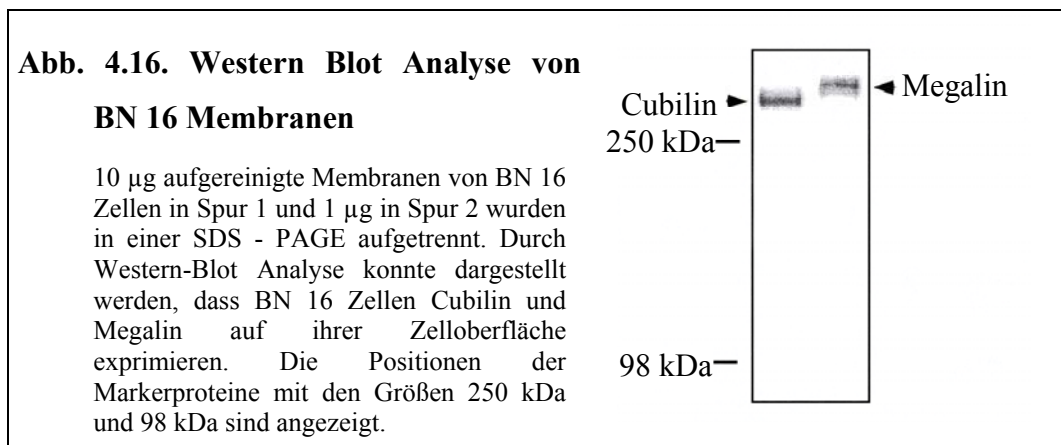
Die obere Kurve in Abb. 4.15. zeigt die Bindung von CCSP an Cubilin bei einer Vorinkubation des Rezeptors mit RAP. Erwartungsgemäß wird eine erhebliche Bindung (400 Response Units) angezeigt, da RAP bekanntlich sehr stark an Cubilin bindet. Eine weitere Bindung von RAP oder auch von CCSP ist nicht mehr möglich. Zu den durch die Pfeile angezeigten Zeitpunkten wurde jeweils eins der Proteine zugegeben, doch ein weiteres Ansteigen der Kurve wurde nicht beobachtet. Die untere Kurve der Abb. 4.15. zeigt noch einmal die Situation ohne Vorinkubation mit RAP. Hierbei ist der veränderte Maßstab der Y-Achse im Vergleich zu den bisherigen Abbildungen zu beachten. Ohne Vorinkubation mit RAP bindet CCSP zu Cubilin, welches mit circa 50 Response Units sichtbar wurde. Dieses Experiment macht deutlich, dass CCSP und RAP an die gleichen Epitope von Cubilin binden, da RAP eine Bindung von CCSP an Cubilin vollständig unterbinden kann.

4.5. CCSP *in vitro*

Bisher konnte die spezifische und Kalziumionen-abhängige Bindung von CCSP zu Cubilin, einem peripheren Membranprotein, welches unter anderem im proximalen Tubulus der Niere exprimiert wird, gezeigt werden. Da tubuläre Epithelzellen CCSP *in vivo* aufnehmen (Brandt et al., 1985), wurde in den folgenden Experimenten untersucht, ob die Bindung von CCSP an Cubilin zur Endozytose des Proteins führt. Auch in diesem Versuch sollten Karzinomazellen des Dottersacks von Brown Norway Ratten (BN 16) als Zellmodell dienen, da beschrieben wurde, dass diese neben Megalin auch hinreichende Mengen an Cubilin exprimieren (Le Panse et al., 1997a).

4.5.1. BN 16 Zellen als Zellmodell

Zunächst wurde mit Hilfe der Western-Blot Analys überprüft, ob die verwendeten BN 16 Zellen tatsächlich genügende Mengen Cubilin und Megalin produzieren (Abb.4.16.). Es wurden 10 (Spur 1) oder 1 µg (Spur 2) der Zellmembranen in einer nicht reduzierenden 4-12 % SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran mit Spur 1 wurde mit einem Kaninchen Anit-Cubilin IgG und die mit Spur 2 mit einem Schaf Anti-Megalin IgG inkubiert. Gebundene Antikörper wurden mittels Chemolumineszenz sichtbar gemacht.



Die Tatsache, dass BN 16 Zellen Cubilin und Megalin exprimieren, konnte durch Western Blot Analyse bestätigt werden. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass keiner der eingesetzten Antikörper kreuzreagiert, d.h., der Anti-Cubilin Antikörper erkennt nicht Megalin oder umgekehrt. Auf dieses Ergebnis werde ich

später noch einmal zurückkommen. Da BN 16 Zellen die Rezeptorausstattung von Zellen des proximalen Tubulus der Niere besitzen, wurden sie im Folgenden genutzt, um zu untersuchen, ob die Bindung von CCSP an Cubilin zur Endozytose des Proteins führt.

4.5.2. CCSP - Aufnahme und Degradation durch BN 16 Zellen

Durch Aufnahme- und Degradationsstudien sollte aufgeklärt werden, ob es zu einer zeitabhängigen Aufnahme und einem darauffolgenden lysosmalen Abbau des Proteins kommt. Hierzu wurde zunächst rekombinantes CCSP mit ^{125}J od radioaktiv markiert. Es besaß eine spezifische Aktivität von 1754 cpm/ng. BN 16 Zellen in 0,5 ml glutaminfreiem DMEM mit 0,2 % (w/v) BSA erhielten 230 ng des rekombinanten ^{125}J - CCSP pro ml Medium. Zusätzlich enthielt das Medium entweder 100 μg / ml Glutathion S-Transferase-RAP Fusionsprotein (GST-RAP), 50 μg / ml Glutathion S-Transferase (GST) oder 200 μM Chloroquin. Nach einer Inkubation bei 37°C wurde in Abständen von einer Stunde die Menge an radioaktiven Abbauprodukten, welche in das Medium ausgeschieden wurde, gemessen (Abb.4.17.).

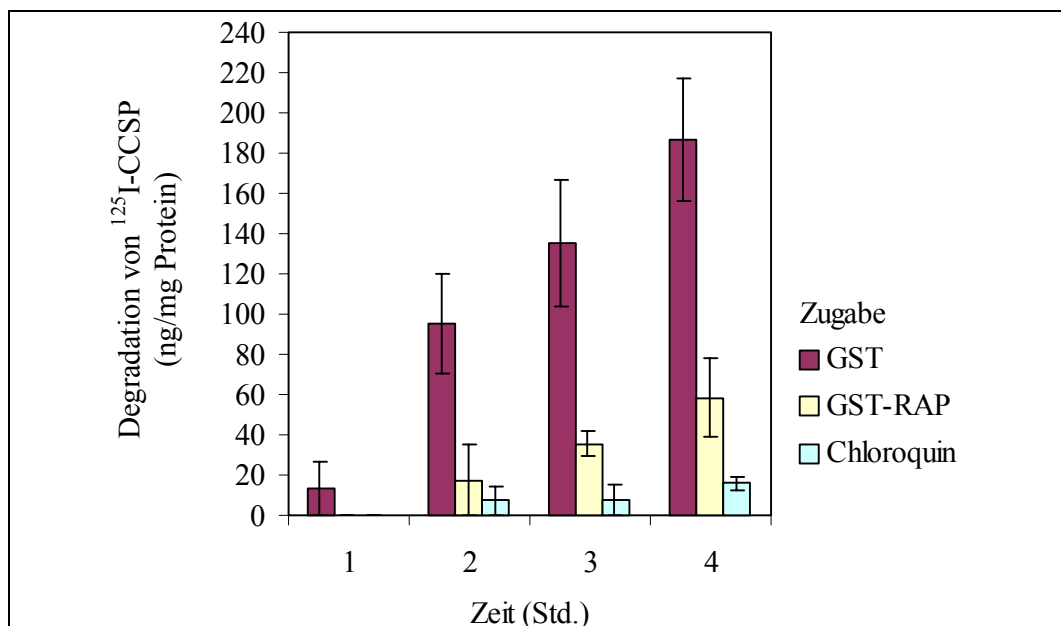


Abb. 4.17. Degradation von rekombinantem CCSP durch BN 16 Zellen

BN 16 Zellen in 0,5 ml glutamin- und serumfreiem DMEM mit 0,2 % BSA (w/v) erhielten 230 ng rekombinantes ^{125}J -CCSP / ml. Es wurde zu den Zellen entweder 50 μg GST / ml, 100 μg GST-RAP / ml oder 200 μM Chloroquin gegeben. Nach einer Inkubation über die angegebenen Zeitintervalle bei 37°C wurde die Menge an radiomarkierten Abbauprodukten im Medium gemessen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und die Standardabweichungen von insgesamt drei Versuchen.

Ohne die Zugabe von Inhibitoren wurden binnen einer Stunde durchschnittlich 13,5 ng, nach zwei Stunden 95ng, nach drei Stunden 135 ng und nach vier Stunden 186,5 ng ¹²⁵J-CCSP pro mg BN 16 Zellen, in die Zellen aufgenommen und degradiert.

Die Zugabe von GST diente der Verifizierung, dass der blockierende Teil des GST-RAP Fusionsproteins das RAP war. Die Zugabe von GST-RAP zum Assay verhindert deutlich die Aufnahme und den Abbau von CCSP.

Nach einer Stunde vermochte RAP eine Aufnahme komplett zu blockieren, nach vier Stunden wurden im Vergleich zu der ungehinderten Aufnahme immerhin 31 % degradiertes ¹²⁵J-CCSP im Zellüberstand vorgefunden.

Mit Zugabe von Chloroquin, einem Inhibitor lysosomaler Degradation, konnte dieser Effekt noch verstärkt werden. Nach vier Stunden konnten lediglich 8,6 % des Normalwertes gemessen werden.

Es kann zusammenfassend gesagt werden, dass sowohl durch RAP, als auch durch Chloroquin die Degradation von CCSP in erheblichen Maße reduziert wurde.

4.5.3. Inhibierung der CCSP Aufnahme durch Antikörpern

Zur Bestätigung, dass der zelluläre Katabolismus von CCSP wirklich abhängig von der Anwesenheit Cubilins ist, wurden Antikörper gegen Cubilin den Aufnahme- und Degradationsstudien zugegeben, um so spezifisch diesen Rezeptor und nicht Endozytose im allgemeinen zu unterbinden.

Für diesen Versuch erhielten BN 16 Zellen wiederum glutaminfreies DMEM mit 0,2 % (w/v) BSA, diesmal in einem Volumen von 0,25 ml.

In den verschiedenen Versuchen wurden 270-450 ng/ml ¹²⁵J-CCSP mit einer spezifische Aktivität von 1754 cpm/ng zugegeben.

Zusätzlich wurden 200 µg IgGs/ml dem Zellmedium zugegeben. Außer dem Antikörper gegen Cubilin wurden als Kontrollen nicht-immune IgGs und ein Antiserum gegen Megalin verwendet.

Nach einer Inkubation von zwei Stunden bei 37°C wurde die Menge der radioaktiven Abbauprodukte im Zellüberstand bestimmt.

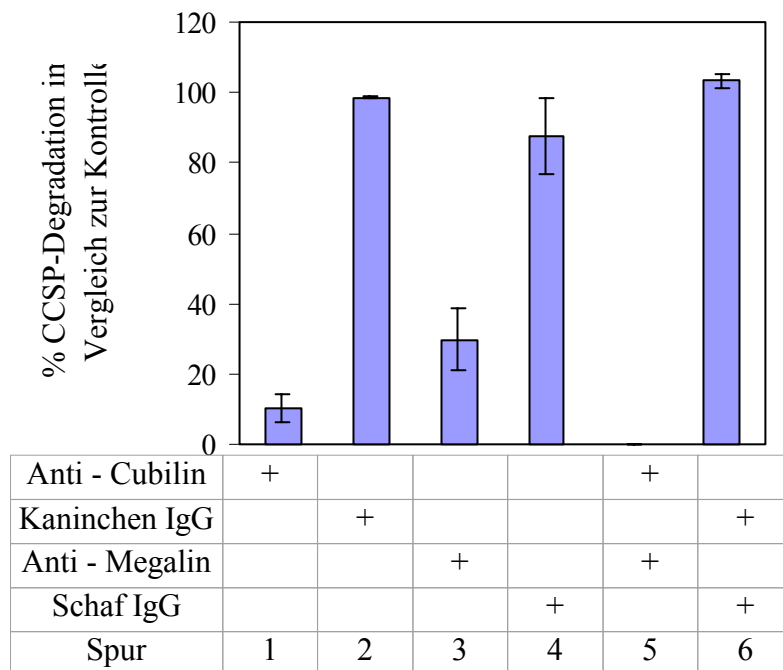


Abb. 4.18. Inhibierung des Abbaus von rekombinatem CCSP durch Zugabe von Anti-Megalin und Anti-Cubilin IgGs

BN 16 Zellen in 0,25 ml glutamin- und serumfreiem DMEM mit 0,2 % BSA (w/v) erhielten 270-450 ng rekombinantes ^{125}J -CCSP/ml. Es wurde zu den Zellen zusätzlich die angegebenen gereinigten IgGs gegeben. Nach einer Inkubation von 2 Stunden bei 37°C wurde die Menge an radiomarkierten Abbauprodukten im Medium gemessen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und die Standardabweichungen von insgesamt drei Versuchen

Der Kontrollwert (100%), mit dem alle Abbauraten hier verglichen wurden, wurde ohne Zugabe jeglicher Antikörper ermittelt. Er liegt je nach Zelldichte zwischen 70 und 450 ng CCSP pro mg Zellprotein. Dieser Wert ist hier nicht gesondert aufgeführt. Wie erwartet führte die Zugabe von Anti-Cubilin IgG zum Zellmedium (Abb. 4. 18. Spur 1) zu einer drastischen Verringerung der Degradation von CCSP. Ein unspezifisches Kaninchen IgG behindert in keiner Weise den zellulären Abbau von CCSP (Spur 2). Jedoch wurde die CCSP Degradation überraschender Weise durch die Beifügung eines Anti-Megalin IgGs (Spur 3) fast ebenso stark inhibiert, wie durch die Zugabe von Anti-Cubilin. Spur 4 zeigt dass ein nicht-immunes Schaf IgG keine Auswirkungen auf die Internalisierung und Degradation von CCSP hatte. Eine kombinierte Gabe von

Anti-Cubilin und Anti-Megalin führte zu einem kompletten Ausbleiben des CCSP Abbaus (Abb. 4. 18. Spur 5). In Spur 6 ist der Effekt von kombinierter Beifügung beider Kontroll-Antikörper gezeigt. Wie bereits in Absatz 4.6.1. erwähnt, erkennen die Anti-Megalin IgGs Cubilin nicht. Daher ist die beobachtete Inhibierung des CCSP Abbaus bei Zugabe von Anti-Megalin Antikörpern nicht durch eine direkte Bindung der Anti-Megalin IgGs erklärbar. Vielmehr ist die Degradation von CCSP durch BN 16 Zellen abhängig von Megalin, einem Rezeptor, der nicht CCSP bindet (Abb. 4.12.). Dieser Befund ist insofern höchst interessant, da er frühere Hypothesen über die Wirkungsweise von Cubilin unterstützt. Cubilin ist ein Protein ohne transmembrane oder zytoplasmatische Domänen, welches nur lose mit der Plasmamembran assoziiert ist. Da Cubilin aber *in vitro* zu Megalin binden kann, wurde vermutet, dass Cubilin im Zusammenspiel mit Megalin als Endozytoserezeptor wirken könnte (Moestrup et al., 1998, Hammad et al., 2000). Möglich wäre es, dass Cubilin durch die Bindung von inhibierenden Antikörpern an Megalin selbst nicht mehr an Megalin binden kann. Dadurch wäre die Aufnahme von Liganden durch Cubilin bei BN16 Zellen behindert.

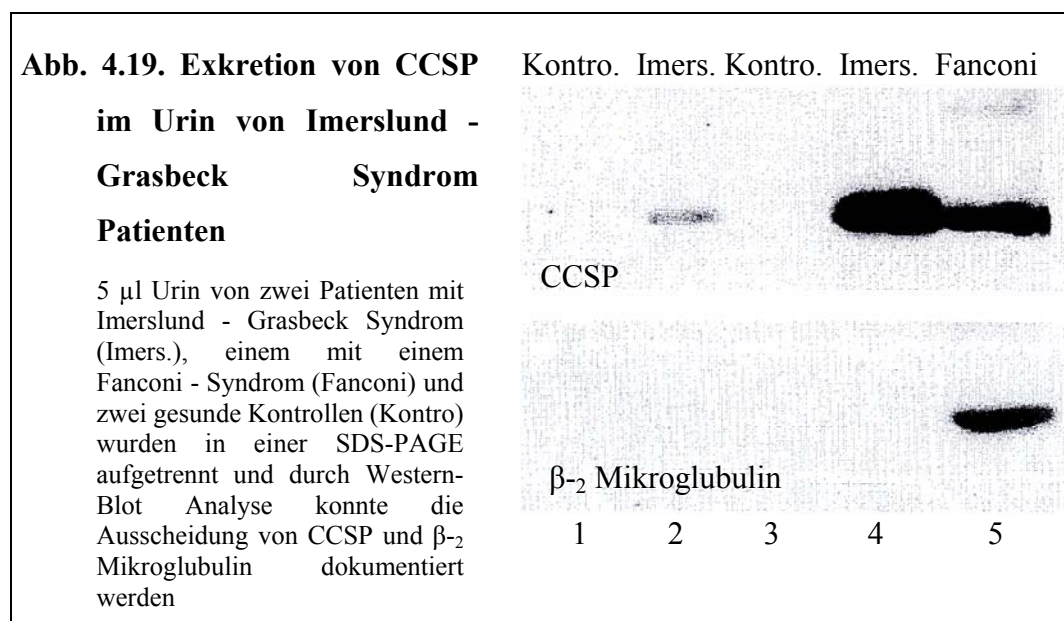
4.6. CCSP *in vivo*

Um zu bestätigen, dass ein Aufnahmemechanismus durch solch ein „Rezeptoren-Doppel“ auch *in vivo* existiert, wurde der CCSP-Metabolismus der Niere in Patienten mit einem Defekt im für Cubilin codierenden Gen oder in einem Mausmodell mit einer Megalin Defizienz untersucht. Wäre die Theorie korrekt, dass CCSP nur durch das Zusammenspiel von Megalin und Cubilin in die Zellen des proximalen Tubulus aufgenommen werden kann, sollten Nieren, denen einer der beiden Rezeptoren fehlt, CCSP im Urin ausscheiden.

4.6.1. CCSP im Urin von Patienten mit einer Cubilin Defizienz

Zunächst wurde der Urin hinsichtlich einer CCSP-Exkretion bei Patienten mit dem Imerslund-Grasbeck Syndrom untersucht. Dieses Syndrom resultiert aus einem ererbten Defekt im Gen codierend für Cubilin (Aminoff et al., 1999). Als Kontrollen wurden Patienten mit einem Fanconi-Syndrom der Niere analysiert.

Sie leiden an einem generellen Defekt in der tubulären Rückaufnahme von Proteinen und scheiden daher zahlreiche Plasmabestandteile aus, die im Normalfall im proximalen Tubulus der Niere reabsorbiert werden. Es wurden jeweils 5 µl Urin von zwei gesunden Menschen (Abb. 4.19. Spur 1 und 3), zwei Patienten mit Imerslund-Grasbeck Syndrom (Spur 2 und 4) und einem Fanconi-Patienten (Spur 5) aufgetragen und in einer 4-20 % nicht-reduzierenden SDS-PAGE aufgetrennt, dann auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran wurde im oberen Teil mit einem Antiserum, das gegen humanes CCSP gerichtet war und im unteren Teil mit einem Antikörper gegen humanes β_2 Mikroglobulin (β_2 M) inkubiert. Gebundene Antikörper wurden mittels Chemolumineszenz sichtbar gemacht.

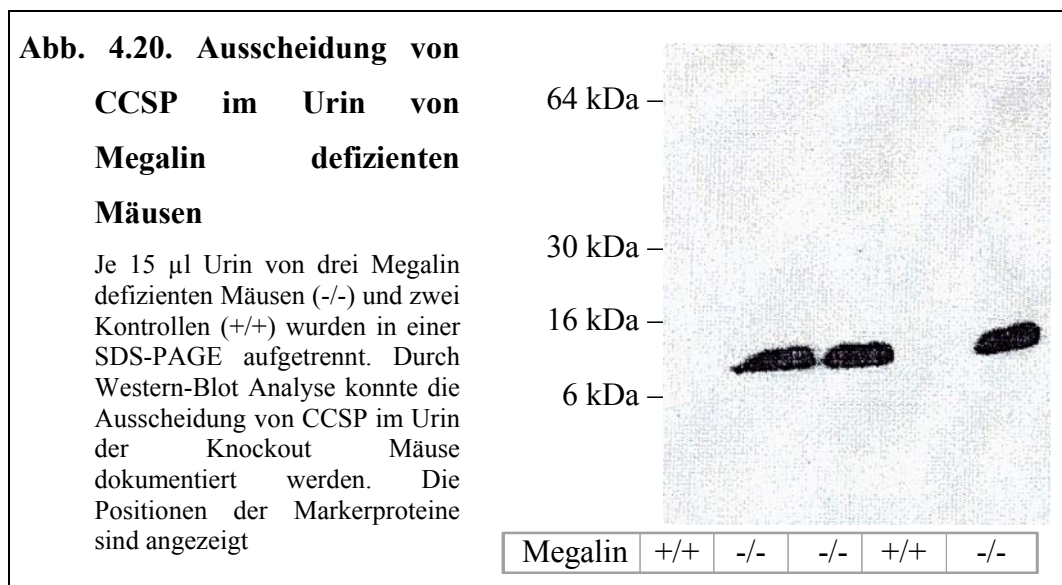


Deutlich sichtbar ist, dass Patienten mit einem Imerslund-Grasbeck Syndrom erhebliche Mengen CCSP mit ihrem Urin ausscheiden (Abb. 4.19. Spur 2 und 4). Bei gesunden Menschen ist dieses nicht zu beobachten (Spur 1 und 3). Allerdings wurden gleiche Mengen CCSP auch im Urin von Fanconi-Patienten nachgewiesen (Spur 5). Da Patienten mit einem Imerslund-Grasbeck Syndrom im Gegensatz zu Fanconi-Patienten nicht an einem generellen und unspezifischen Defekt in der tubulären Rückaufnahme von Proteinen leiden, konnte in ihrem Urin kein β_2 Mikroglobulin nachgewiesen werden. Es wird als ein Markerprotein für eine tubuläre Fehlfunktion angesehen (Pergande et al., 1994) und ist deutlich sichtbar

in Spur 5, dem Urin des Fanconi-Patienten. Insgesamt wurden vier Patienten mit Imerslund-Grasbeck Syndrom, drei mit einem Fanconi-Syndrom und sechs Kontrollen analysiert. Alle Proben stimmten mit den hier in Abb. 4.19. gezeigten Ergebnissen überein. Diese Analysen ergaben, dass Patienten mit einer generellen Cubilin Defizienz CCSP in ihrem Urin ausscheiden und, dass die Exkretion von CCSP nicht auf einen unspezifischen Defekt in der tubulären Reabsorption zurückzuführen ist.

4.6.2. CCSP im Urin Megalin defizienter Mäuse

Da bisher noch keine Patienten mit einer Megalin Defizienz beschrieben worden sind, wurden für die weiteren Untersuchungen Megalin Knockout Mäuse herangezogen. Hierzu wurden je 15 µl Urin von zwei Kontrolltieren und drei Megalin defizienten Mäusen in einer 4-20 % nicht-reduzierenden SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Diese wurde dann mit einem Antiserum, das gegen CCSP aus der Ratte gerichtet war inkubiert. Gebundene Antikörper wurden durch Chemolumineszenz sichtbar gemacht.

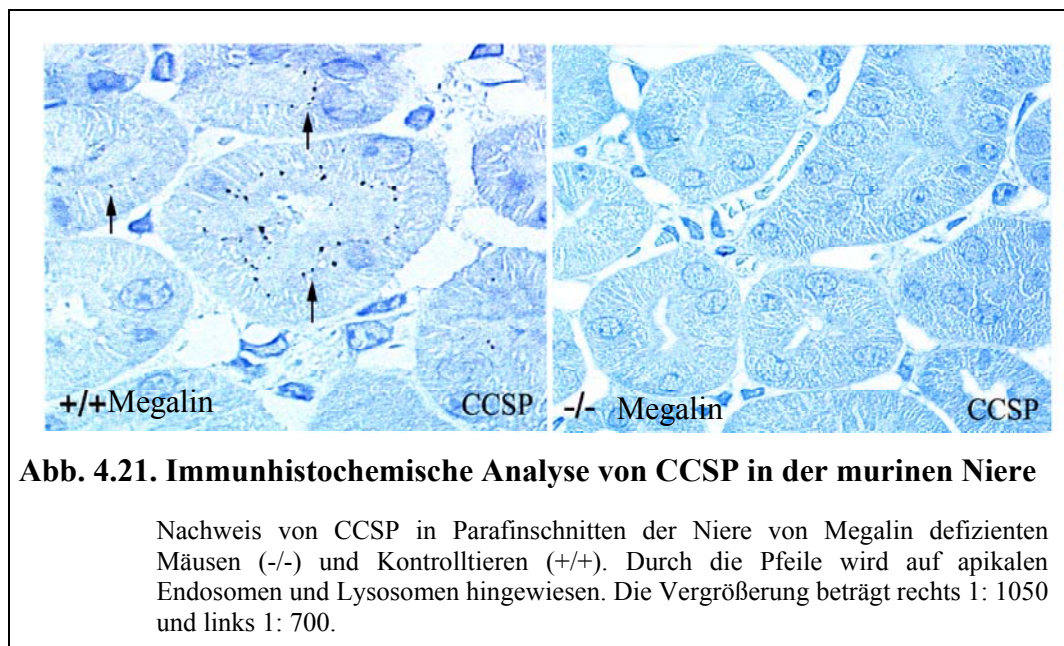


Tatsächlich ist CCSP im Urin von Megalin defizienten Mäusen, jedoch nicht im Urin von Kontrolltieren nachweisbar (Abb. 4.20.). Mit diesem Ergebnis wird die Hypothese, dass beide Rezeptoren für die tubuläre Aufnahme von CCSP

verantwortlich sind, unterstützt. Tiere, die nur Cubilin, aber kein Megalin besitzen, scheiden CCSP in ihrem Urin genauso aus, wie Patienten, die zwar Megalin in der Niere exprimieren, aber kein Cubilin.

4.6.3. CCSP Lokalisation in der Niere

Die fehlende Aufnahme von CCSP in der Niere Megalin defizienter Mäuse wurde weiterhin durch eine immunohistochemische Analyse von murinen Nierenschnitten bestätigt. Hierzu wurden Parafinschnitte von Nieren Megalin defizienter Mäuse und von Kontrolltieren mit einem Antiserum gegen CCSP aus der Ratte gefärbt.

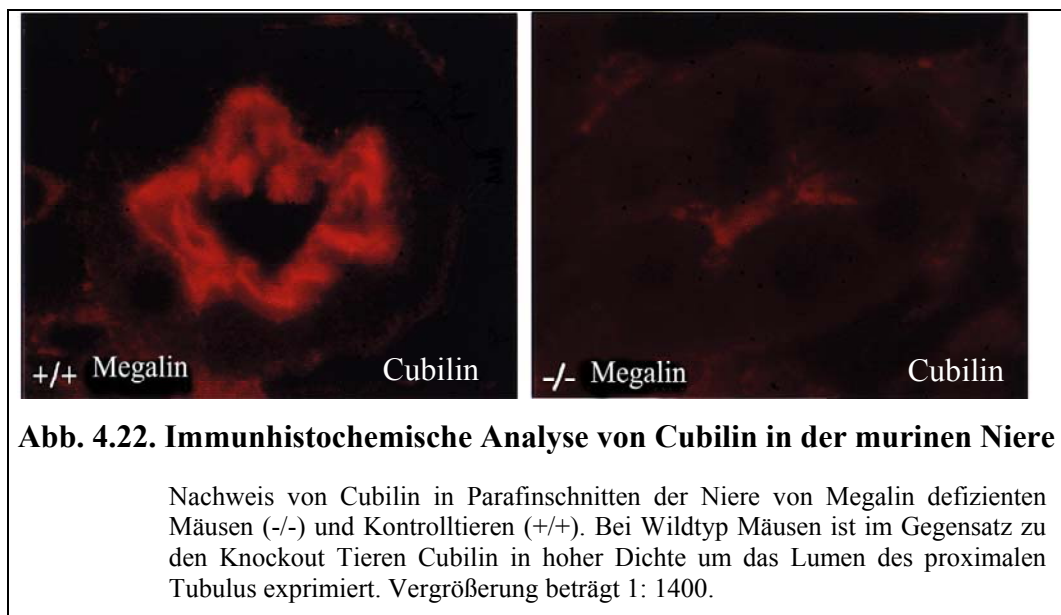


In Abb. 4.21. ist links der Schnitt einer Kontrollniere zu sehen, rechts der einer Megalin Knockout Maus.

Die Pfeile markieren das in Endosomen und Lysosomen lokalisierte CCSP in Zellen des proximalen Tubulus der Kontrollniere und weisen auf eine Aufnahme des Proteins aus dem glomerulären Filtrats hin. In der Megalin defizienten Maus ist kein intrazelluläres CCSP im proximalen Tubulus der Niere nachweisbar.

4.6.4. Cubilin in der Niere

Um die Folgen einer Megalin Defizienz auf die Expression des funktionalen Cubilin Rezeptors zu untersuchen, wurde die immunohistochemischen Analysen von murinen Nierenschnitten auf den Nachweis von Cubilin ausgedehnt. Hierzu wurden Parafinschnitte von Nieren von Megalin defizienten Mäusen und Kontrolltieren mit einem Antiserum gegen Cubilin inkubiert. Diese Antikörper wurden durch Fluoreszenz sichtbar gemacht.



In Abb. 4.22. ist bereits bei relativ geringer Vergrößerung zu sehen, dass in der Niere der Megalin defizienten Maus weit weniger Cubilin ausgebildet wird.

Während im linken Bild, dem Nierenschnitt der Wildtyp Maus der Bürstensaum des proximalen Tubulus der Niere stark gefärbt ist, sind in der Knockout Maus nur geringfügige Anfärbungen zu erkennen.

Eine genauere Lokalisation von Cubilin in der Niere ist durch Elektronenmikroskopie möglich. Dieses Experiment wurde im Labor von Erik Christensen, Department für Zellbiologie der Universität Aarhus mit seiner freundlichen Unterstützung durchgeführt. Es wurden ultradünne Gefrierschnitte der Nieren von Megalin defizienten Mäusen (Abb. 4.23. oberes Bild) und Wildtyp Kontrollnieren (unteres Bild) mit einem Antiserum gegen Cubilin inkubiert, dem eine Inkubation mit ein goldgekoppeltem Sekundärantikörper und eine elektronenmikroskopischen Aufnahme folgte.

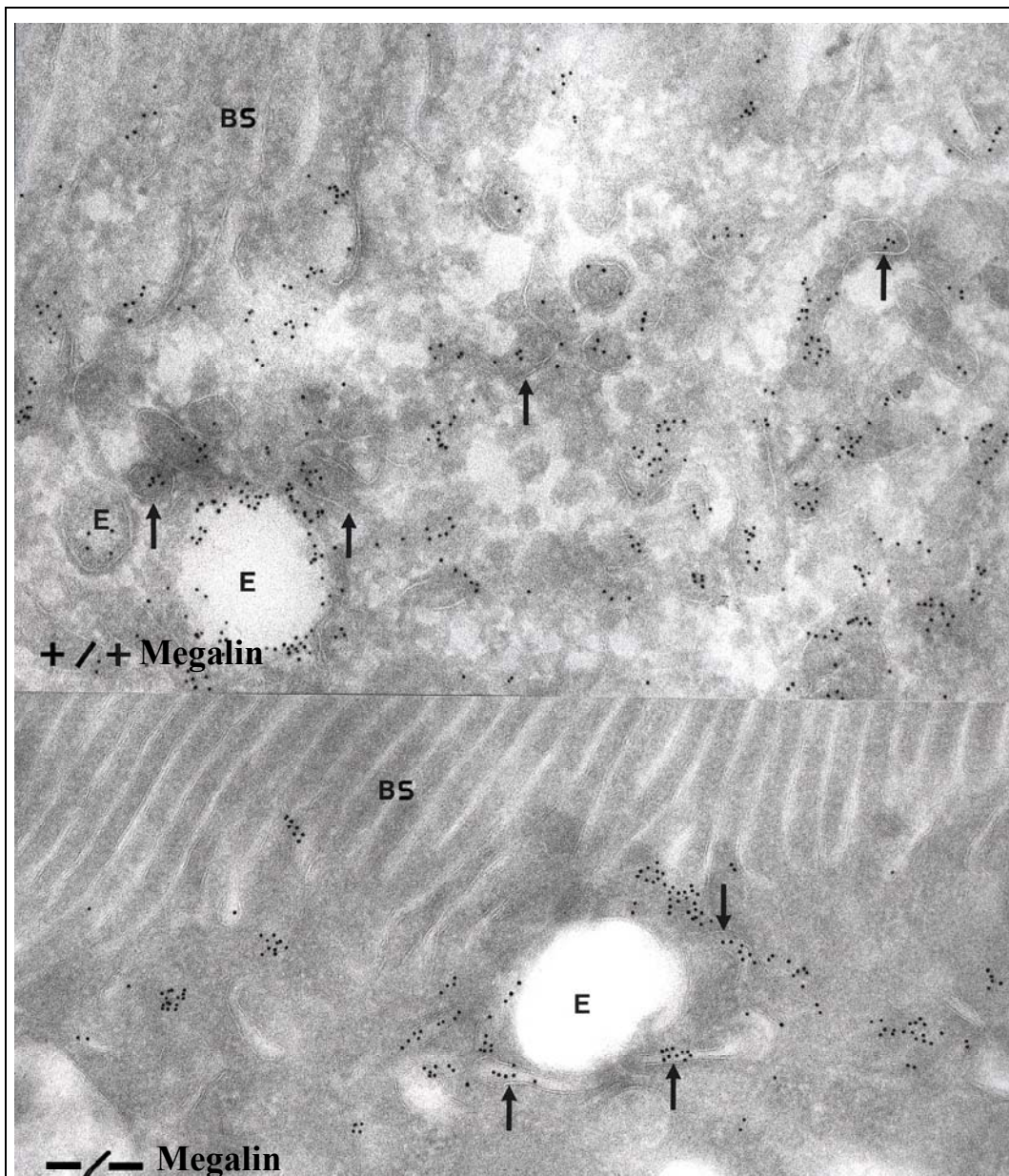


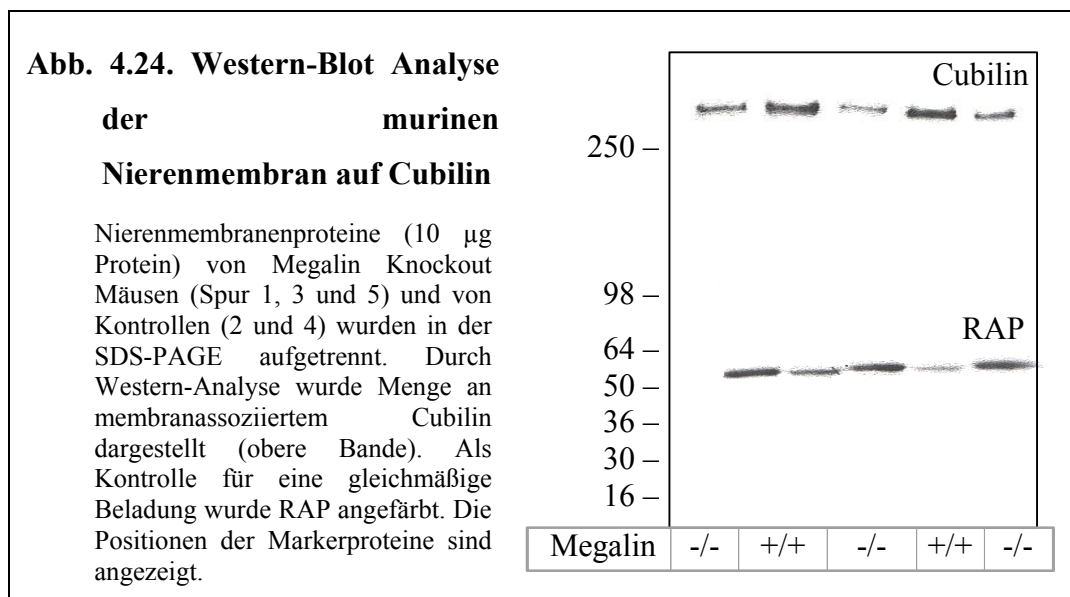
Abb. 4.23. Elektronenmikroskopische Untersuchung auf Cubilin in der Niere der Maus

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Schnitten durch die proximalen Tubuli der Nieren von Wildtyp Mäusen (oben, +/+) und Megalin defizienten Tieren (unten, -/-). Die Pfeile im oberen Abschnitt markieren die dichten, apikalen Tubuli. Im unteren Bild markieren die Pfeile Transportvesikel.

BS = Bürstensaum, E = Endosomen; Vergrößerung 1: 70000

In der elektronenmikroskopischen Analyse wurde Cubilin in Endosomen und Membranvesikeln gefunden, die eine recycelnde Aufgabe ausüben, sogenannte dichte, apikale Tubuli. Sie dienen der Rückführung von internalisierten Rezeptoren an die Zelloberfläche. Diese Beobachtung deckt sich mit der

beschriebenen Funktion Cubilins als Endozytoserezeptor. In der Megalin defizienten Maus hingegen wurde Cubilin nicht in dichten, apikalen Tubuli oder Endosomen gefunden. Die angezeigten Membranvesikel sind von geringerer Dichte, es dürfte sich bei ihnen um Vesikel handeln, die neu synthetisiertes Cubilin vom Trans-Golgi Netzwerk an die Oberfläche transportieren. Es bleibt festzuhalten, dass die Gesamtmenge an Cubilin in der Niere Megalin defizienter Mäuse deutlich reduziert ist. Unterstützt wird dieses Ergebnis durch eine Western-Blot Analyse, in der Membranextrakte von Nieren Megalin defizienter Mäuse direkt mit denen von Kontrolltieren verglichen wurde. Jeweils 10 µg Nierenmembranen pro Spur wurden in einer 4-16 % SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der obere Teil dieser Membran wurde mit einem Antikörper gegen Cubilin, der untere Teil in seiner Funktion als Ladekontrolle mit einem Antikörper gegen RAP inkubiert.



In Abb. 4.24. Spur 1, 3 und 5 in sind die Nierenmembranen von Megalin defizienten Tieren aufgetragen. Die Menge an Cubilin ist im Vergleich zu denen der Kontrolltiere in Spur 2 und 4 reduziert. Diese Resultate bedeuten, dass in Megalin defizienten Nieren die Ausstattung mit Cubilin reduziert ist.

4.6.5. CCSP in der Lunge

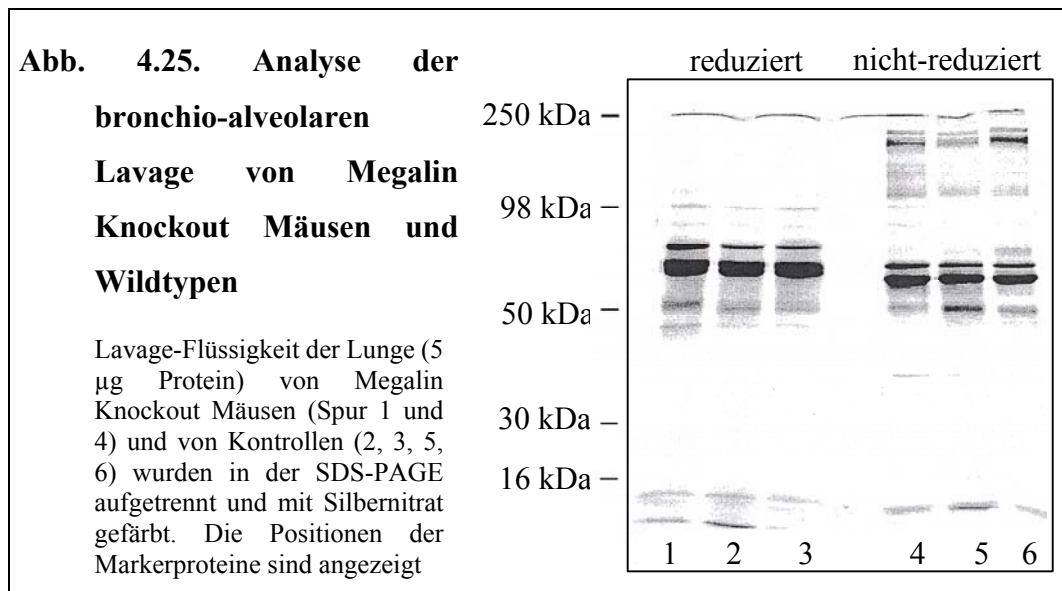
Die bisherigen Versuche haben demonstriert, dass CCSP im proximalen Tubulus der Niere vermittelt durch das Rezeptoren-Doppel Cubilin und Megalin aufgenommen wird.

Als nächstes wurde untersucht, ob dieser Mechanismus auch in der Lunge für den CCSP Katabolismus verantwortlich ist. Da kein Lungenmaterial von Patienten mit einem Imerslund-Grasbeck Syndrom zur Verfügung stand, wurde das Hauptaugenmerk auf die Lungen von Megalin defizienten Mäusen gelegt.

4.6.5.1. Gesamtproteinbild bei Megalin defizienten Tieren und Kontrollen

Zu diesem Zweck wurde die bronchio-alveolare Lavage von Megalin Knockout Mäusen mit der von Wildtypen verglichen.

Hierzu wurden je 5 µg Protein aus der Lungen-Lavage von Wildtyp Mäusen (Abb. 4.25. Spur 2, 3 und 5), sowie von Knockout Mäusen (Spur 1 und 4) in einer 4-15 %, reduzierenden oder nicht-reduzierenden SDS-PAGE aufgetrennt und mit Silbernitrat gefärbt.



Es konnte weder im reduzierten noch im nicht-reduzierten Zustand ein offensichtlicher Unterschied im Gesamtproteinmuster entdeckt werden.

4.6.5.2. CCSP-Quantifizierung in der Lavage von Megalin Knockout und Kontrolltieren

Um doch noch eventuelle Unterschiede in der Menge an CCSP in den Lungen-Lavages nachzuweisen, wurde der nicht-reduzierende Teil einer identischen SDS-PAGE wie unter 4.7.5.1. beschrieben auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem Antiserum gegen CCSP aus der Ratte inkubiert (Abb.4.26.).

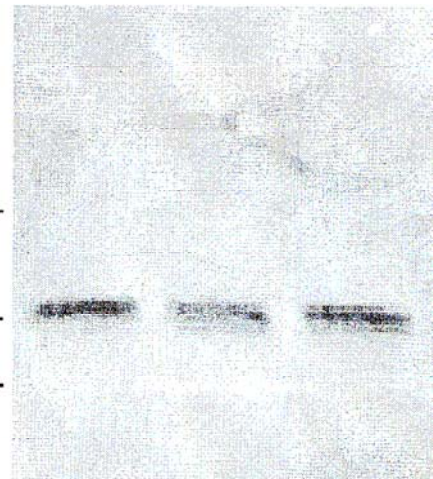
Abb. 4.26. Western-Blot Analyse der bronchio-alveolaren Lavage von Megalin Knockout Mäusen und Wildtypen

Lavage-Flüssigkeit der Lunge (5µg Protein) von Megalin Knockout Mäusen (Spur 1) und von Kontrollen (2 und 3) wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western-Blot Analyse wurde die Anwesenheit von CCSP in allen Proben dokumentiert. Die Positionen der Markerproteine sind angezeigt.

18,4 kDa.

14,2 kDa.

6,2 kDa.



Spur	1	2	3
Megalin	-/-	+/+	+/+

In Spur eins ist die Lavage eines Megalin defizienten Tieres aufgetragen. Sie ist in Hinblick auf die Menge CCSP, die sich in der Lunge befindet, nicht von denen der Kontrolltiere zu unterscheiden.

Dieses Ergebnis bedeutet, dass in Megalin defizienten Lungen sich keine größeren Mengen CCSP ansammeln. Es schließt jedoch nicht aus, dass ein alternativer Rezeptor für den Katabolismus von CCSP in der Lunge existiert.

Mit diesen Resultaten konnte erstmalig gezeigt werden, dass ein Co-Rezeptorsystem für die Resorption eines Proteins im proximalen Tubulus der Niere notwendig ist.

Ein Rezeptor in diesem „Doppel“ ist Megalin, ein Vertreter der LDL R Gen Familie. Der andere Mitspieler ist Cubilin, ebenfalls ein extrem großer, multifunktioneller Rezeptor, dem allerdings eine Transmembrandomäne und ein zytoplasmatischer Anhang fehlt.

CCSP bindet zuerst an Cubilin und der Komplex aus Rezeptor und Transportprotein assoziiert mit dem Endozytoserezeptor Megalin und wird in die Zellen aufgenommen.

Fehlt Megalin oder Cubilin in der Niere, wird CCSP mit dem Urin ausgeschieden und ist für den Körper verloren. Die Niere ist das Gewebe, in dem CCSP normalerweise aus dem Primärharn rückresorbiert wird. Zu einer Anreicherung

des Proteins und einer darauf folgenden Zerstörung des Gewebes, kommt es, wenn CCSP im Komplex mit PCBs vorliegt.

PCBs sind enzymatisch von uns nicht abbaubar sind. Folglich kommt es zu einer Einlagerung und Anreicherung.

Utero- oder Blastokinin, Bezeichnungen für CCSP, die für das homologe Protein bei Hasenartigen üblich sind, weisen auf einen Wirkungsort von CCSP hin. Blastokinin wurde als der Bestandteil der uterinen luminalen Flüssigkeit beschrieben, der *in vitro* die Blastulation induziert und die Reifung der Blastozysten des Kaninchens fördert.

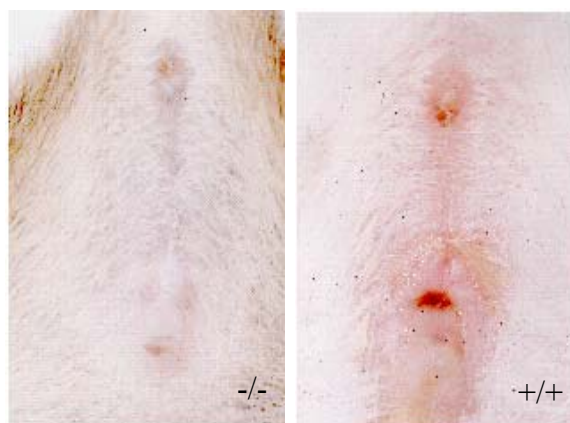
Es ist also davon auszugehen, dass CCSP entweder durch sich selbst eine Signalkaskade anregt oder durch seine Aufnahme in Zellen im Uterus Substanzen zur Verfügung stellt, die unerlässlich für reproduktive Vorgänge sind. In beiden Fällen ist ein CCSP bindender Rezeptor notwendig. Von Megalin wissen wir nun, dass es die CCSP Aufnahme in die Niere vermittelt. Ich möchte im Folgenden darstellen, ob Megalin auch für eine CCSP Aufnahme im Uterus in Frage kommt und/oder welche Funktion Megalin im Uterus ausüben könnte.

4.7. Expression von Megalin im Uterus

Interessanterweise bilden zirka 60 % der weiblichen Megalin Knockout Mäuse eine Anomalie der Geschlechtsöffnung aus (Abb.4.27.), die als vaginale Obstruktion oder Vaginalverschuß beschrieben wird.

Abb. 4.27. Vaginalverschluss bei Megalin defizienten Mäusen

Die Geschlechtsöffnung eines Megalin Knockout Weibchens (links) und vergleichend die normale Entwicklung bei einem Kontrolltier (rechts). Die Vagina des Megalin defizienten Tieres bleibt durch eine Haut verschlossen, die sich üblicherweise mit Erreichen der Geschlechtsreife zurückbildet.



Mäuseweibchen werden normalerweise mit einer geschlossenen Vagina geboren, die sich im Laufe ihrer Geschlechtsreife öffnet.

Dieses ist ein von 17β -Östradiol abhängiger Vorgang (Allen et al., 1984). Im Durchschnitt öffnet sich die Vagina in der dritten bis vierten Woche nach der Geburt (Safranski et al., 1993).

Es ist bisher nicht beschrieben worden, dass Progesteron in diesen Vorgang eingreift. CCSP als Transportmolekül für Progesteron sollte deshalb bei dem Verlust des die Vagina verschließenden Häutchens keine Rolle spielen.

Eine Expression von Megalin im Uterus hingegen ist dokumentiert worden (Saito et al., 1994, Zheng et al., 1994).

Der Rezeptor, exprimiert von Epithelzellen und dem Lumen zugewandt, kleidet das Innere des Uterus aus. Welche Funktion Megalin im Inneren des Uterus zukommt, ist bisher nicht bekannt.

Es ist jedoch denkbar, dass Megalin hier, ähnlich wie im proximalen Tubulus der Niere, für z. B. die Endozytose von Steroiden verantwortlich ist. Progesteron und Östradiol sind nur die wichtigsten Hormone, die für einen geregelten Zyklus notwendig sind.

Um Megalins Rolle in der Geschlechtsreifung und später während des Zyklus näher zu untersuchen, wurde zunächst eine detaillierte Analyse der Expression des Rezeptors im Uterus, beginnend mit der postembryonalen Entwicklung bis zum Erwachsenenalter, unternommen. Diese Untersuchung sollte eine erste Auskunft liefern, ob die Rezeptorexpression abhängig vom Hormonstatus der Tiere ist.

4.7.1. Megalin Expressionsmuster während der postnatalen Entwicklung

Durch eine immunohistochemische Analyse des murinen Uterus soll dargestellt werden, zu welchem Zeitpunkt Megalin exprimiert wird.

Arbeiten von Annette Hammes und Robert Spoelgen aus dem Labor von Thomas Willnow haben gezeigt, dass Megalin während der gesamten Embryonalentwicklung nicht im Uterus des Embryos nachgewiesen werden kann (persönliche Kommunikation).

Daher beschränkt sich meine Arbeit auf eine Untersuchung der postembryonalen Entwicklung der Tiere.

Hierzu wurden Parafinschnitte der Uteri in verschiedenen Entwicklungsstadien mit einem Antiserum gegen Megalin, das aus der Ziege gewonnen wurde, gefärbt. Zur besseren Orientierung wurden die Gewebe mit Mayers Hämalaun Färbelösung gegengefärbt.

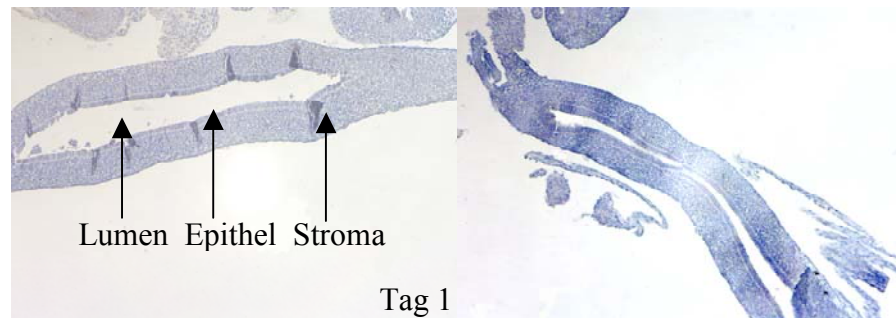
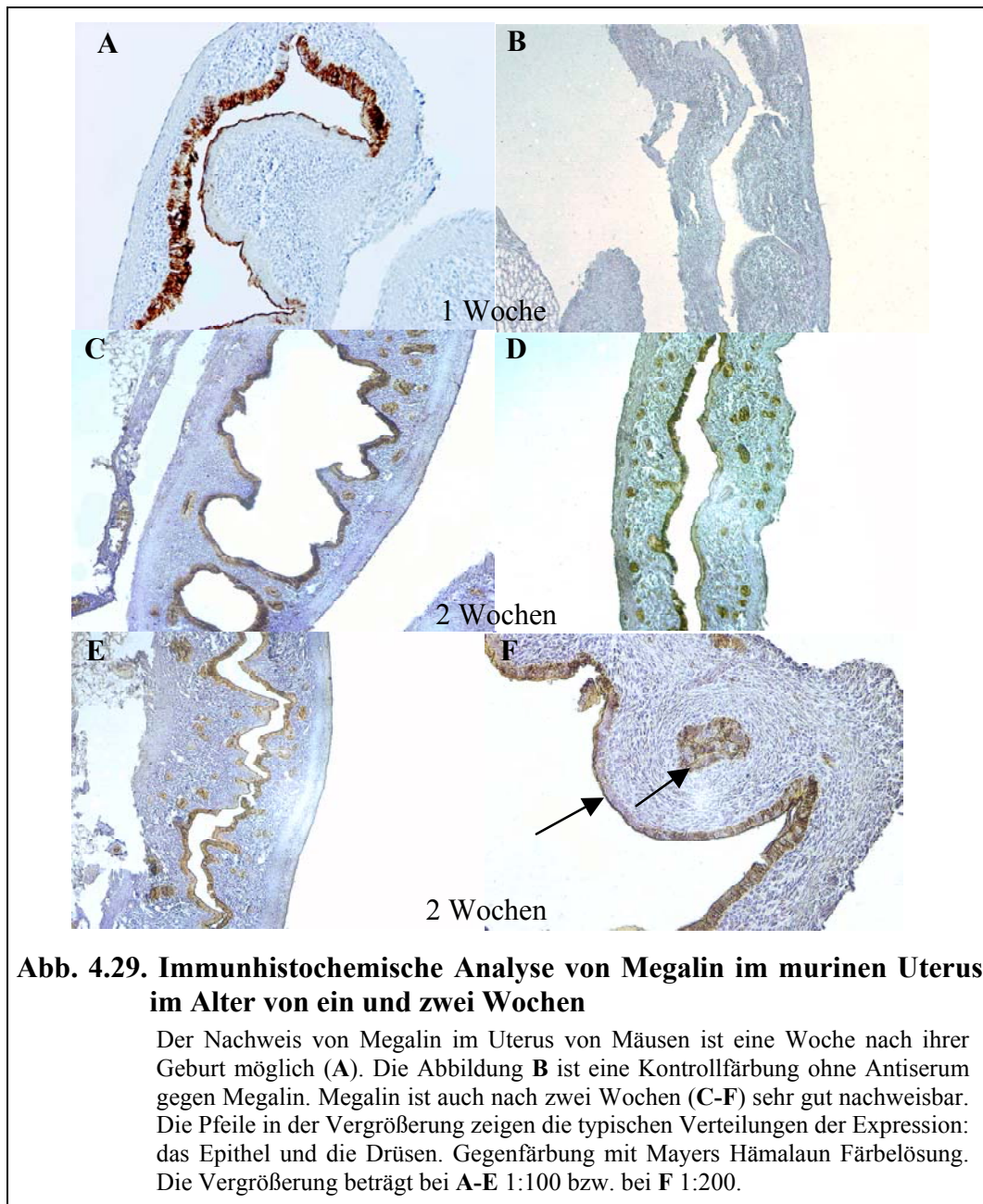


Abb. 4.28. Immunhistochemische Analyse von Megalin im murinen Uterus von Neugeborenen

Megalin kann im Uterus von Mäusen am Tag nach ihrer Geburt nicht nachgewiesen werden. Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun Färbelösung. Die Vergrößerung beträgt 1:100.

Die in Abb. 4.28. gezeigten Parafinschnitte präsentieren die Situation einen Tag nach der Geburt. Neugeborene Mäuse exprimieren kein Megalin in ihrem Uterus.

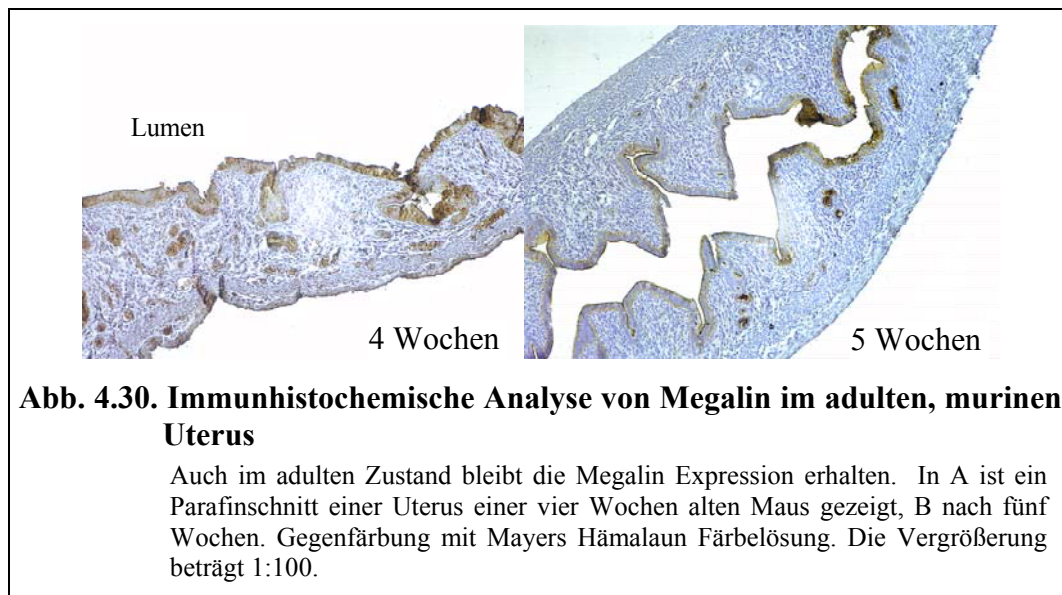
Die nächste Abbildungen zeigen Uteri von ein und zwei Wochen alten Tieren.



Schon eine Woche nach der Geburt wird vom Uterusepithel Megalin exprimiert (Abb. 4.29. A). In diesem Alter sind bei den Tieren noch keine Brustwarzen sichtbar, die Ohren sind erst seit 3-4 Tagen geöffnet. Abb. 4.29 B zeigt eine Kontrollfärbung, bei der das Antiserum gegen Megalin weggelassen wurde. Noch eine Woche später, also 14 Tage nach der Geburt findet man Megalin auch in vaginalem Drüsengewebe (Abb. 4.29. D - F).

Wir können also feststellen, dass Megalin im Uterus bereits lange vor dem Erreichen der Geschlechtsreife ausgebildet wird. Im Alter von zwei Wochen haben die Jungtiere gerade ihre Augen geöffnet.

In Abb. 4.30. sind die Uteri adulter, geschlechtsreifer Weibchen im Alter von vier (A) und fünf (B) Wochen gezeigt. Zu diesem Zeitpunkt ist das Häutchen, das die Vagina verschloss, bereits zurückgebildet.



Megalin wird vom Epithel und in den Drüsen ausgebildet. Es sind allerdings beim Vergleich der beiden Uteri in Abb. 4.30. Schwankungen in der Stärke der Expression zu erkennen. Der Uterus des älteren Weibchens exprimiert weniger Megalin. Das kann zwei Gründe haben. Erstens ist es möglich, dass nach vier Wochen die Megalin Expression abnimmt. Zweitens ist es denkbar, dass in Abhängigkeit des Zyklus und damit der involvierten Hormone, auch die Menge an im Uterus exprimiertem Rezeptor schwankt.

4.7.2. *Megalin Expression in Abhängigkeit des Zyklus*

Deshalb habe ich versucht, bei 21 Tagen alten, gerade noch geschlechtunreifen Tieren, den Zyklus durch Hormongaben zu simulieren. Zu diesem Zeitpunkt ist die Vagina noch geschlossen, die Weibchen würden aber binnen weniger Tage bis einer Woche von alleine anfangen, den Zyklus zu durchlaufen.

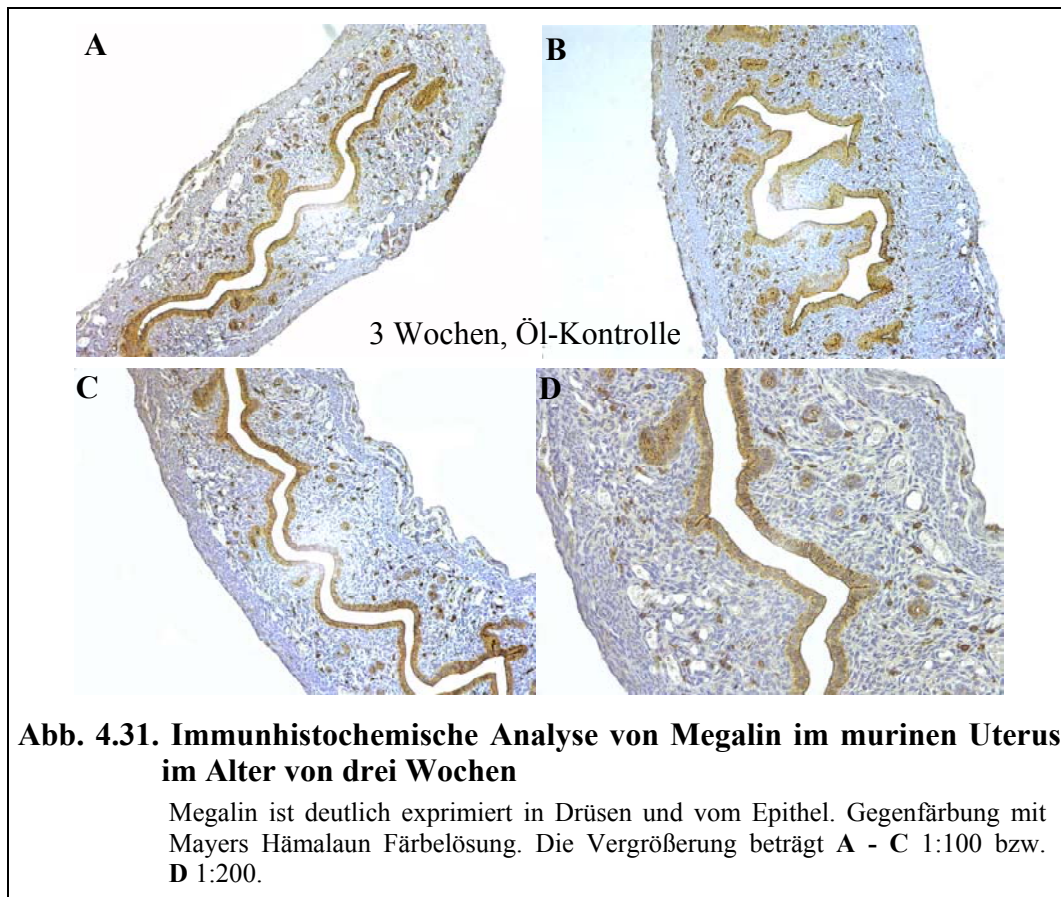
Selbstverständlich setzt der Auf- und Abbau der Uterusschleimhaut, die Reifung und dann der Eisprung ein Zusammenspiel von vielen Hormonen und anderen Faktoren voraus. Das gesamte Blutbild verändert sich, die Körpertemperatur und Puls ebenfalls.

Doch es lässt sich durch 17β -Östradiol- und Progesterongaben dieses simulieren bzw. einleiten (Huang et al., 1999). So konnte ich zum einen sicherstellen, dass die von mir verglichenen Tiere sich in der gleichen Phase des Zyklus befanden und zum anderen analysieren, ob sich in Hinblick auf die Expression von Megalin die Phasen von einander unterscheiden.

Zum Zweck der künstlichen hormonellen Synchronisation wurden die Mäuse in drei Gruppen eingeteilt. Der ersten Gruppe, bei der die Proliferationsphase des Zyklus eingestellt werden sollte, in der sich die Uterusschleimhaut aufbaut, wurde über vier Tage $1\text{ }\mu\text{g/Tag}$ 17β -Östradiol in Öl sub cutan (s. c.) injiziert. Die zweite Gruppe erhielt $1\text{ }\mu\text{g}$ 17β -Östradiol plus 1 mg Progesteron in Öl pro Tag. Diese Behandlung induziert die Sekretionsphase, in der die Uterusschleimhaut bereit für die Einnistung eines befruchteten Eies ist. Eine Kontrollgruppe erhielt lediglich Speiseöl gespritzt. Wie bereits erwähnt wurden für diese Versuche drei Wochen alte Weibchen genommen, da die Tiere zu diesem Zeitpunkt noch geschlechtsunreif waren. Die Geschlechtsöffnungen der Kontrollgruppe waren auch nach Abschluss der vier Tage noch nicht geöffnet.

Um zu kontrollieren, ob die Tiere auf die Hormone reagierten, wurden die Gewichte der Uteri gemessen. Bei Mäusen, die 17β -Östradiol/Progesteron erhielten, verändert sich bei Mäusen das Gewicht der Gebärmutter nur wenig im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Spritzt man den Tieren jedoch 17β -Östradiol, nimmt das Nassgewicht um bis das vierfache zu. Dieses ist nicht durch eine dickere Schleimhaut zu erklären, sondern die Uteri schwellen aufgrund einer massiven Anreicherung von ULF in den beiden Hörnern und dem Corpus Uterus an.

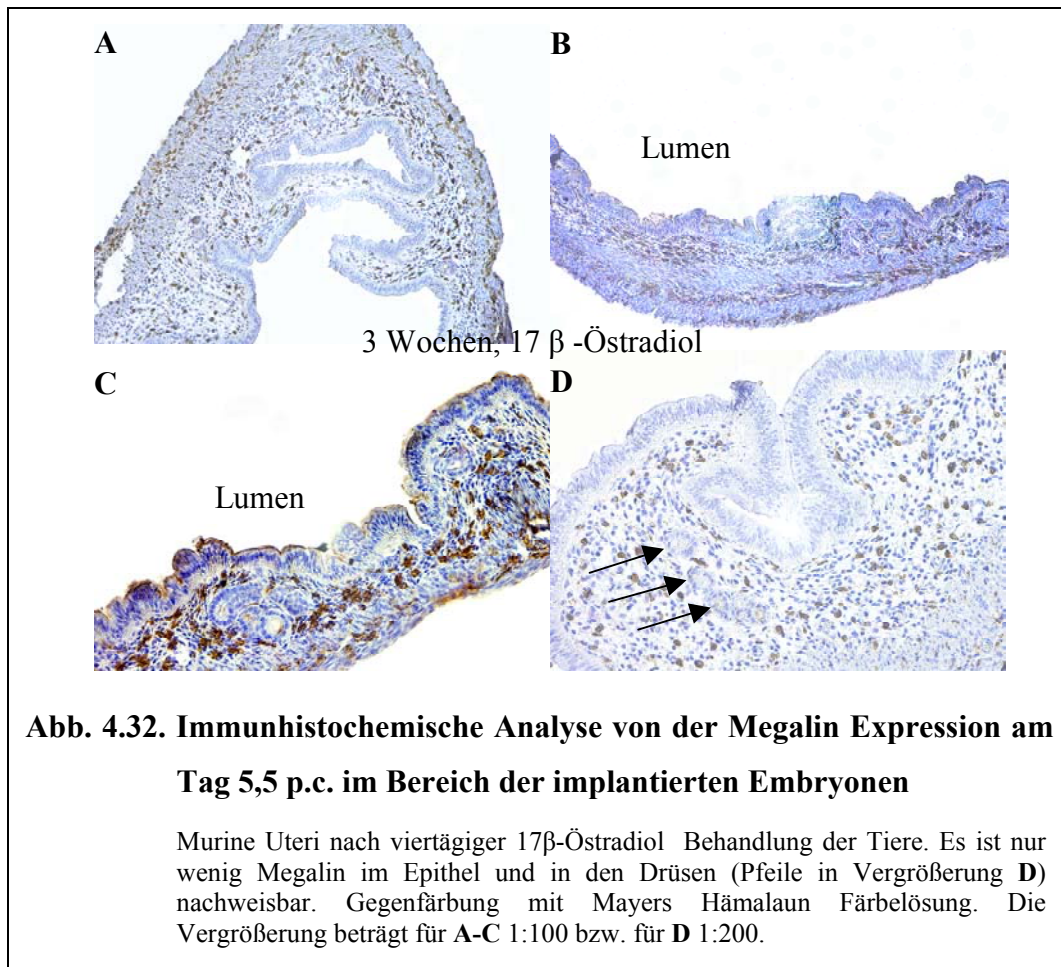
In Abbildung 4.31. sind die Uteri der Kontrolltiere zu sehen, denen Öl gespritzt wurde. Diese Tiere sind als geschlechtsunreif zu betrachten.



Die geschlechtsunreifen Tiere im Alter von drei Wochen zeigen ohne künstlich Hormonstimulation eine sehr kräftige Megalin Expression, die sich nicht wesentlich von zwei Wochen alten Tieren (Abb. 4.29. C-F) unterscheidet. Der Rezeptor wird von Drüsen und vom Epithel gebildet.

In der simulierten Proliferationsphase hingegen, also bei 17β -Östradiol Injektionen, wird im Uterus weit weniger Megalin gebildet.

Doch es ist nicht nur die Menge an Rezeptor, die sich verändert hat, sondern vor allem seine Verteilung.



Das dem Lumen zugewandte Epithel zeigt hier nur in einem von drei Tieren eine relevante Expression von Megalin auf der Zelloberfläche (Abb. 4.32. **C**). In der Vergrößerung (**D**) zeigt sich, dass der Rezeptor auch nicht mehr stark in den Drüsen nachweisbar ist. Vielmehr sind die einzigen Anfärbungen in Vesikeln im Stroma zu finden.

Bei kombinierter 17β -Östradiol- und Progesterongabe (Abb. 4.33.) dagegen, also Einleitung einer sekretorischen Phase, in der die Uterusschleimhaut auf die Einnistung eines befruchteten Eies vorbereitet ist, ähnelt zwar die Verteilung von Megalin im Uterus der geschlechtsunreifer Tiere, jedoch wird weit weniger Rezeptor exprimiert.

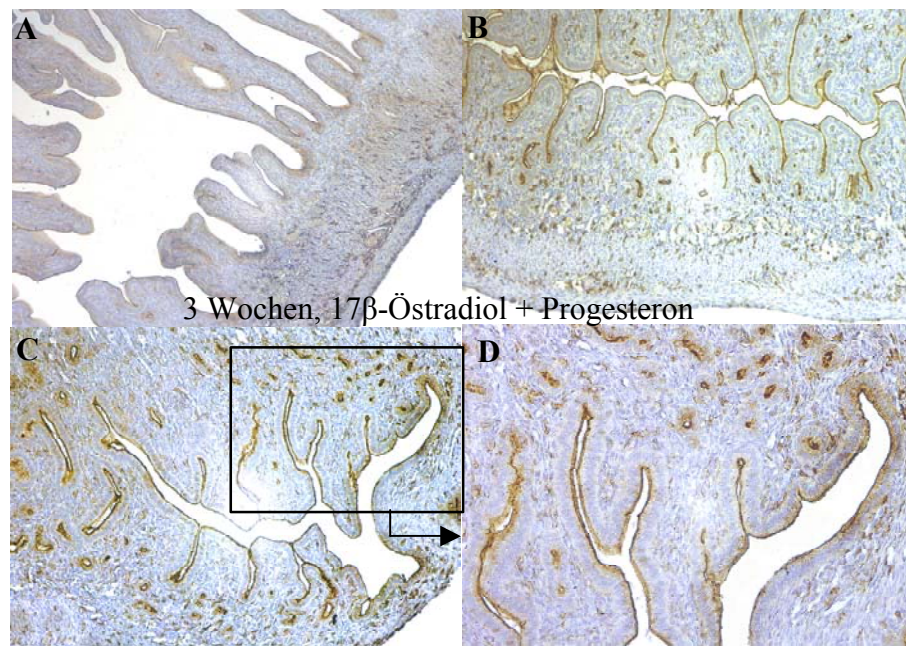


Abb. 4.33. Immunhistochemische Analyse von Megalin im murinen Uterus während der Sekretionsphase

Murine Uteri nach viertägiger 17 β -Östradiol-/Progesteronbehandlung der Tiere. Megalin ist im Epithel und in den Drüsen nachweisbar. Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun Färbelösung. Die Vergrößerung beträgt **A-C** 1:100 bzw. **D** 1:200.

Megalin ist im Epithel und in den Drüsen von Mäusen nach einer Behandlung mit 17 β -Östradiol-/Progesteron nachweisbar. Im Vergleich zum juvenilen Uterus ist die Expression von Megalin allerdings deutlich reduziert.

Betrachtet man die beiden Gruppen, in denen der Hormonstatus synchronisiert wurde und ihre Kontrollgruppe vergleichend, ist der subjektive Eindruck, dass im geschlechtsunreifen Zustand am meisten Megalin im Uterus exprimiert wird. Unabhängig von der Verteilung des Rezeptors ist in der Proliferationsphase am wenigsten Rezeptor nachweisbar.

Dazwischen liegt die sekretorische Phase. Hier bewirkt die gleichzeitige Präsenz von Progesteron - und Östradiol, dass Megalin höher als bei alleiniger 17 β -Östradiolgabe exprimiert wird, doch deutlich weniger als bei juvenile Mäusen.

Da sich jedoch histologische Analysen nur bedingt zur Quantifizierung eignen, wurde die Menge an Megalin mRNA bestimmt.

Hormonell synchronisierten Mäusen und Kontrolltieren wurden von nach vier Tagen Hormoninjektionen die Uteri entnommen und mRNA aus den Geweben gewonnen.

Von der mRNA wurde durch reverse Transkription cDNA hergestellt. Anschließend konnte mit der Methode der TaqMan[®]-PCR die tatsächlich produzierte Megalin-mRNA quantifiziert werden. Zusätzlich zu den beiden Primern wird dieser PCR eine Sequenz-spezifische Sonde zugegeben. Diese Sonde ist mit einem Fluoreszein-Derivat markiert, das allerdings aufgrund der räumlichen Nähe zu einem ebenfalls die Sonde markierenden Quencher-Farbstoff nicht zur Fluoreszenz angeregt werden kann. Die hybridisierte Sonde wird durch die Exonuklease Aktivität der Polymerase hydrolysiert, so dass die beiden Farbstoffe ihre Nähe zueinander verlieren.

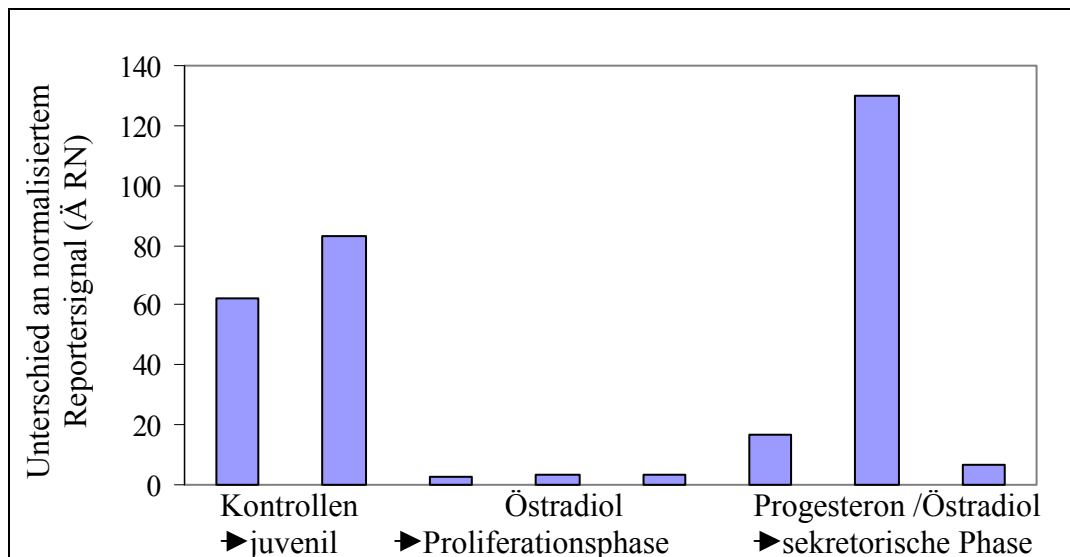


Abb. 4.34. TaqMan[®]-PCR zur Quantifizierung von Megalin im Uterus

Als Ergebnisse der TaqMan[®]-PCR werden Unterschiede des normalisierten Signals zum kleinsten, gemessenen Wert angegeben (dieses Tier ist hier nicht aufgeführt). Für die noch juvenilen Kontrolltiere wurde ein durchschnittliches Δ RN von 71,65 gemessen, für die 17 β - Östradiol behandelten Tiere ein Δ RN von 3,4 und für die Progesteron/Östradiol behandelten Tiere ein Δ RN von 51,23, allerdings mit einer hohen Standardabweichung aufgrund des mittleren Progesteron/Östradiol behandelten Tieres.

Die TaqMan[®]-PCR (Abb.4.34.) gibt die Bestätigung für den optischen Eindruck, den die immunhistologische Untersuchung der Uteri lieferte.

Die Tiere in der Proliferationsphase, bei denen kaum noch Megalin im Epithel und in den Drüsen sichtbar war (Abb. 4.32.), bilden mit einem durchschnittlichen Δ RN von 3,4 nur ein Zwanzigstel an Megalin mRNA im Vergleich zu juvenilen Tieren. Für diese Tiere wurde ein durchschnittlichen Δ RN von 71,65 berechnet, dieser Wert entspricht dem Eindruck der histologischen Analysen (Abb. 4.31.), in der eine sehr starke Färbung des mukosen Epithels und der Drüsen zu sehen ist. Die Werte für die Tiere in der sekretorischen Phase geben im Durchschnitt einen Δ RN von 51,23. Der durchschnittliche Wert entspricht in der Tat dem Eindruck der Antikörperfärbungen (Abb. 4.33.). Doch eines der Tiere zeigt mit einem Δ RN von 130 ein höheres Signal als alle anderen Tiere.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass generell die Menge an exprimiertem Megalin im Uterus mit Erreichen der Geschlechtsreife abnimmt. Während des Zyklus ist die Menge an gebildetem Rezeptor Schwankungen unterworfen. Diese Schwankungen sind bedeutend kleiner als die beim Wechsel vom juvenilen zum adulten Tier.

Als nächstes sollte untersucht werden, wie die Megalin Expression bei trächtigen Weibchen aussieht, deren Embryonen im Begriff sind, zu implantieren.

Megalin wird vom sich entwickelnden Embryo produziert. Diese Expression findet bereits vor und auch nach der Implantation statt (Buc-Caron et al., 1987, Gueth-Hallonet et al., 1994). Von der Blastocyste wird Megalin im Trophoektoderm gebildet, nach der Einnistung im Dottersack, im amniotischen Ektoderm und im Neuroektoderm.

Da die Megalin Expression in der Gebärmutter während des Menstruationszyklus offensichtlich stark reguliert wird, sollte im Folgenden überprüft werden, ob die Implantation eines Embryos ebenfalls Einfluss auf die Expression von Megalin hat. Zu diesem Zweck wurden Parafinschnitte von Uteri samt gerade implantierter Embryonen (Tag 5,5 p.c.) mit Anti-Megalin IgG gefärbt.

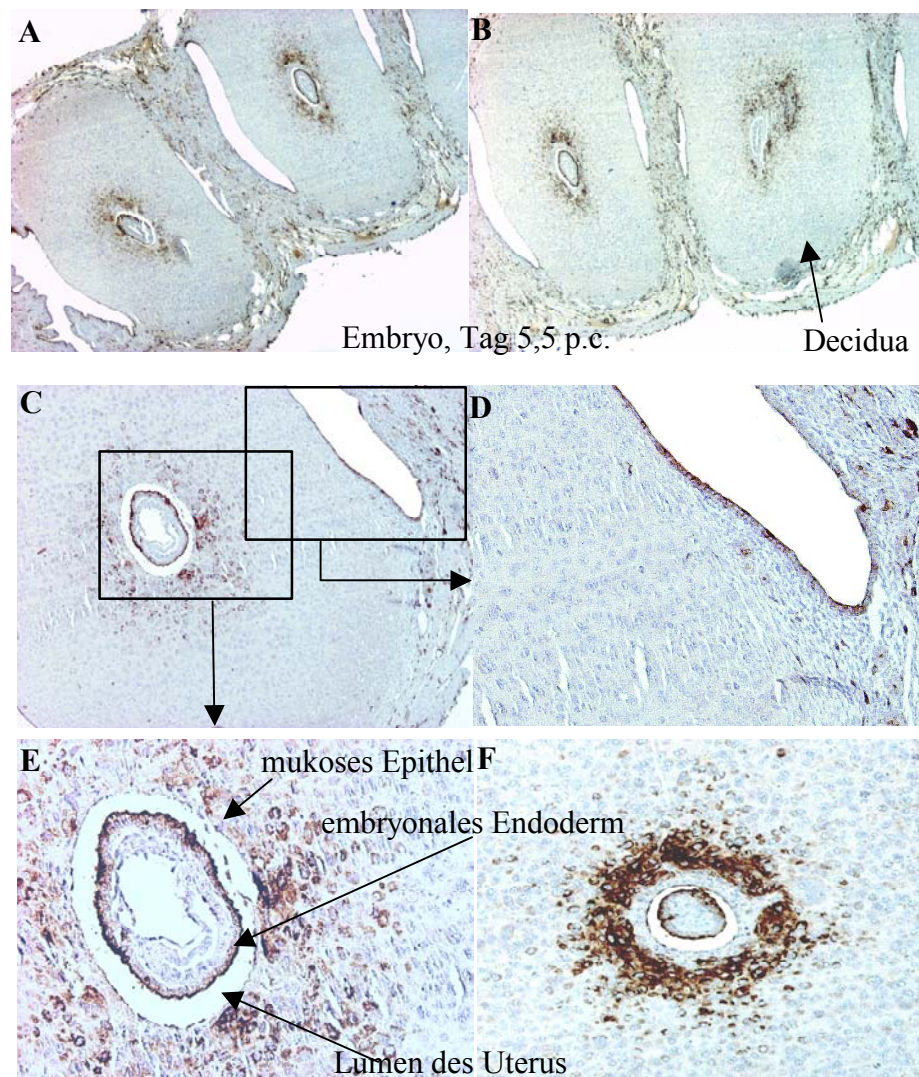


Abb. 4.35. Immunhistochemische Analyse vom Uterus samt Embryonen einer trächtigen Maus am Tag 5,5 p.c. auf Megalin

Tag 5,5 p.c. wurden Uteri von trächtigen Mäusen samt gerade implantierten Embryonen entnommen. Aus Bild C wurden zwei Ausschnitte vergrößert, die die Expression im uterinen Epithel (D) zeigen, sowie die vom Embryo und die ihn umgebende mukose Epithel (E). Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun Färbelösung. Vergrößerung für A + B 1:20, C + F 1:50, D + E 1:100.

Wie bereits bei nicht schwangeren Tieren ist Megalin auch am Tag der Implantation im uterinen Epithel exprimiert (4.35. D). Zusätzlich konnte eine starke Megalin Expression im mukosen Epithel um den implantierten Embryo festgestellt werden. Tatsächlich ist die Implantation durch eine feine Abstimmung von Progesteron und 17β -Östradiol bestimmt. Kurz vor der tatsächlichen

Einnistung der Embryonen, schon am Tag 4,5 p.c. kommt es im Uterus zu einer vermehrten Ausschüttung von 17β -Östradiol, hervorgerufen durch eine Sekretion des luteinisierenden Hormons. Ohne diesen Östrogenschub sind die Embryonen nur noch weitere 24 Stunden überlebensfähig (Rugh, 1993). Megalin wird zu diesem Zeitpunkt am Ort der Implantation gebildet. Ein Fehlen Megalins verhindert jedoch nicht zwangsläufig die Einnistung des Embryos, denn überlebende Megalin Knockout Weibchen, deren Vagina sich öffnet, sind in der Lage, Junge auszutragen. Am Tag 1 nach der Geburt (Abb. 4.36. C) ist Megalin im Epithel und in Drüsen nachweisbar, die Expression im mukosen Epithel ist mit der von Mäusen vergleichbar, die nie gebärend waren (A und B).

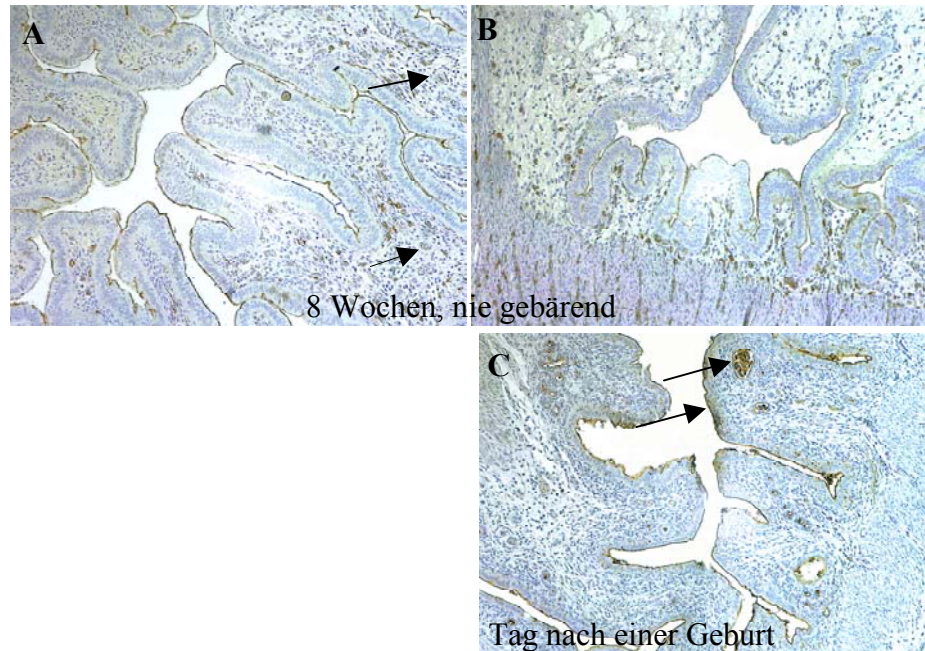


Abb. 4.36. Immunhistochemische Analyse von Megalin im murinen Uterus adulter Weibchen ohne Geburt und direkt nach einer Geburt

C Nach einer Geburt ist die Megalin im Epithel und in Drüsen nachweisbar.

A und B Vergleich der Expression im mukosen Epithel mit Mäusen, die nie gebärend waren. Bei diesen ist faktisch kein Megalin in Drüsen nachweisbar. Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun Färbelösung. Vergrößerung 1:100.

Es ist bekannt, dass Megalin in der adulten Maus von Epithelzellen des Uterus exprimiert wird. Die bisherigen Versuche haben demonstriert, dass dieses bereits früh in der postembryonalen Entwicklung, lange vor Erreichen der Geschlechtsreife geschied. Ferner steht die Megalin Expression unter

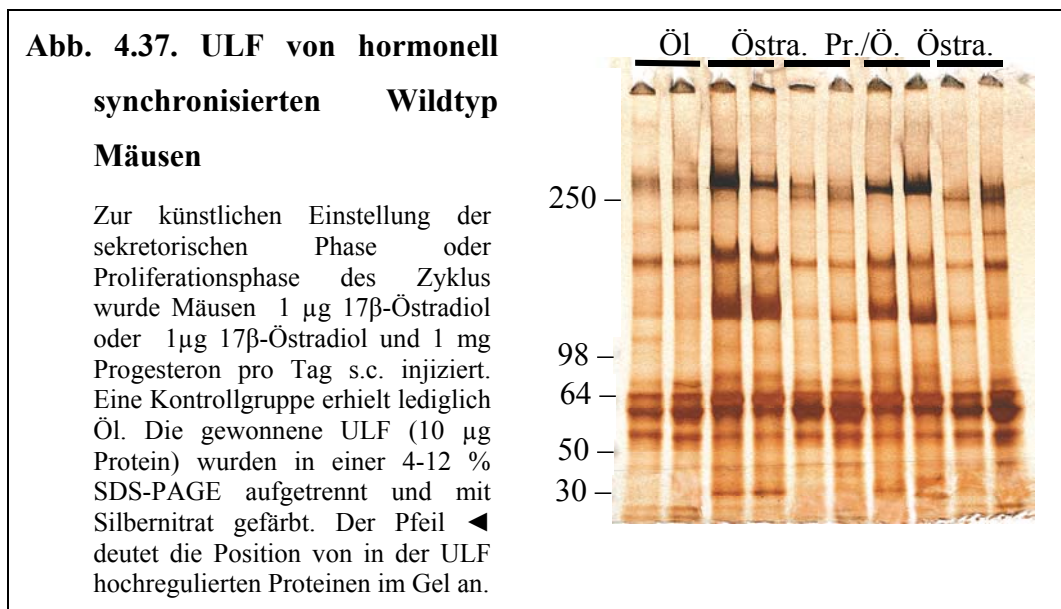
hormonellem Einfluss. In juvenilen Tieren ist viel Megalin im Uterusepithel nachweisbar, mit Erreichen der Geschlechtsreife jedoch wird deutlich weniger Megalin exprimiert. Auch innerhalb des Zyklus ist die Megalin Expression Schwankungen unterworfen. In der Proliferationsphase, in der sich unter hohen Östradiolkonzentrationen die Uterusschleimhaut aufbaut, wird wenig Megalin detektiert. In der sekretorischen Phase, in der zusätzlich zum 17 β -Östradiol- auch das Progesteronniveau hoch ist, wird wieder mehr Megalin gebildet. In dieser Phase des Zyklus ist die Gebärmutter Schleimhaut empfänglich für die Implantation der Embryonen. Zum Zeitpunkt, an dem sich die Embryonen in die Uterusschleimhaut einnisten, wird Megalin auch verstärkt im dem zugewandte Epithel produziert. Die physiologische Funktion dieser stark regulierten Expression von Megalin im Uterus während der Geschlechtsreifung, des weiblichen Zyklus und der embryonalen Implantation ist nicht bekannt. Es ist anzunehmen, dass Megalin in seiner Funktion als Endozytoserezeptor aus dem Lumen des Uterus, in der sich die uterine, luminale Flüssigkeit (ULF) befindet, Proteine aufnimmt. Dies könnte von Bedeutung für den Stoffwechsel des uterinen Gewebes oder der Signalweiterleitung dienen. Zur Analyse der Funktion von Megalin im Uterus ist der erste Schritt, herauszufinden, welchen Liganden Megalin aus der ULF in die Zellen des Epithels aufnimmt. Daher wird im Folgenden untersucht werden, welche Proteine aus der ULF an Megalin binden.

4.8. Liganden für Megalin in der uterinen, luminalen Flüssigkeit (ULF)

In den verschiedenen Stadien des Zyklus werden unterschiedliche Proteine in der ULF hoch- und herunterreguliert. CCSP findet z.B. seine höchste Expression in der Zeit nach der Ovulation, in der aus dem Follikel durch den Eisprung der Corpus luteum entsteht (Muller-Schottle et al., 1999). Diese Phase ist im Uterus die Sekretionsphase, in der die Gebärmutter Schleimhaut empfänglich für die Implantation der Embryonen ist. Dies bedeutet, dass die CCSP - Produktion durch Progesteron und 17 β -Östradiol angeregt wird. Die Konzentration von Laktoferrin in der ULF ist durch 17 β -Östradiol induzierbar (Pentecost et al., 1987, Jefferson et al., 2000). Ebenfalls 17 β - Östradiol stimuliert die 24p3 Expression im Uterus, das Protein wird in die ULF sekretiert (Chu et al., 1996, 2000).

4.8.1. Proteinmuster von ULF im Zyklus

Als ersten Schritt zur Identifikation eines möglichen Interaktionspartners für Megalin wurden von hormonell synchronisierten Mäusen und Kontrolltieren die Proteinkonzentrationen der ULF verglichen. Wie in Absatz 4.7.2. beschrieben, wurden geschlechtsunreifen Weibchen über vier Tage 17 β -Östradiol oder 17 β -Östradiol in Kombination mit Progesteron injiziert, um die Proliferations- oder sekretorische Phase des Zyklus einzustellen. Eine Kontrollgruppe bekam s. c. Öl gespritzt. Die entnommenen Uteri wurden mit einer isotonen Natriumchloridlösung gespült, um die ULF aus dem Lumen der Gebärmutter zu gewinnen. Jeweils 10 μ g Gesamtprotein der gesammelten ULF wurden in einer 4-12 % SDS-PAGE aufgetrennt und mit Silbernitrat gefärbt.



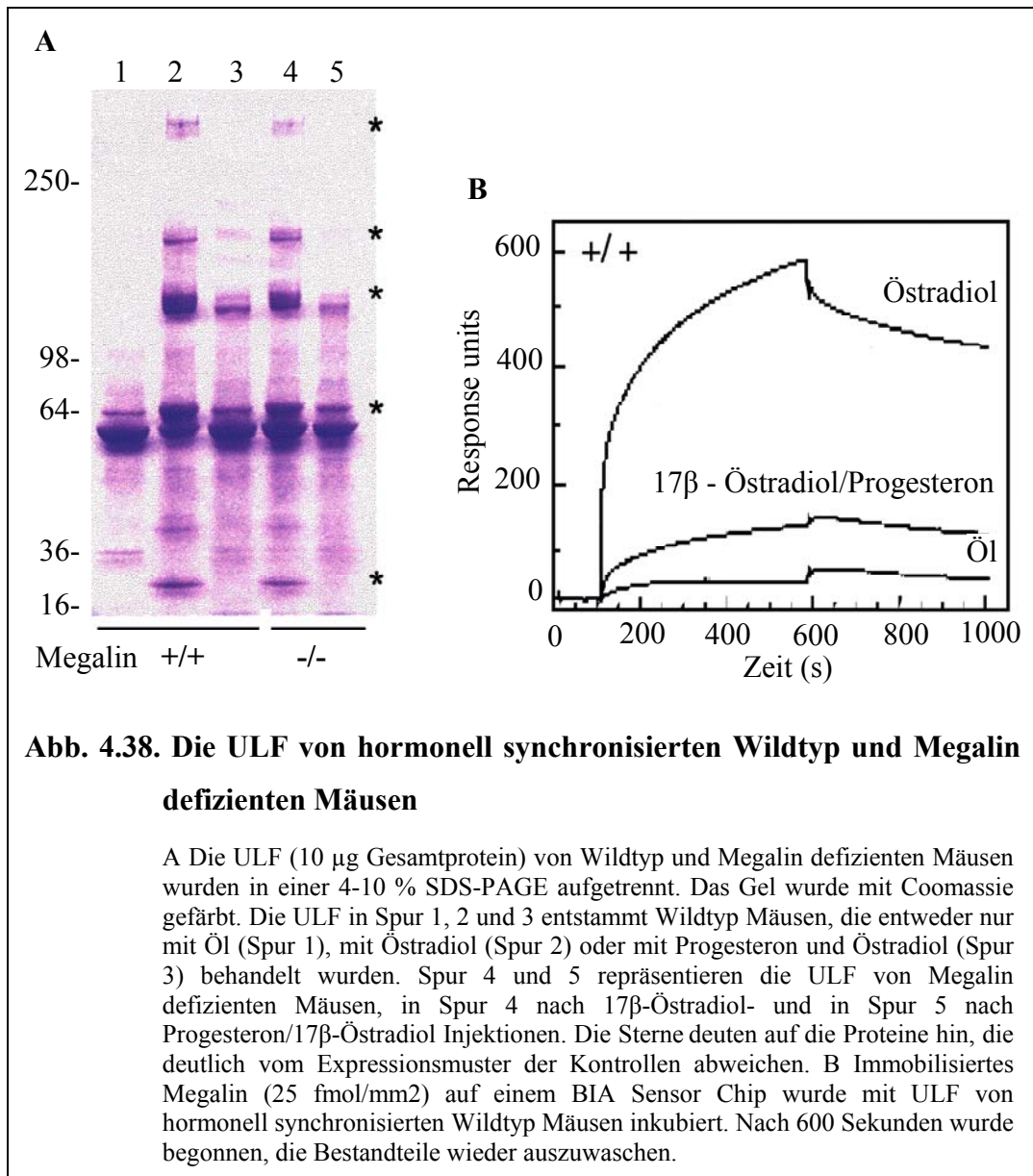
Die mit Silbernitrat gefärbte SDS-PAGE (Abb.4.37.) zeigt, dass in der Proliferationsphase mindestens fünf Proteine deutlich induziert, bzw. in ihrer Expression hochreguliert sind. Auf diese Proteine wird durch die links positionierten Pfeile im Gel hingedeutet. Es handelt sich um Proteine oder Aggregate die in der SDS – PAGE bei etwa 250 kDa, ungefähr 200 kDa, zirka 120 kDa, sowie gut 70 kDa und knapp unter 30 kDa migrieren. Im Gegensatz zum deutlich abweichenden Proteinexpressionsmuster der ULF bei 17 β -Östradiol Injektionen kann zwischen denen von Kontrollen und Progesteron/17 β -Östradiol behandelten Tieren kein offensichtlicher Unterschied festgestellt werden. Dieses schließt nicht grundsätzlich aus, dass es während der sekretorischen Phase zu

einer Veränderung der Proteinkomposition in der ULF kommt. Jedoch wären es nur relativ geringe Proteinmengen, die sich verändern würden.

4.8.2. Proteinmuster von ULF im Zyklus von Megalin defizienten Mäusen

Um zu testen, ob Megalin für die Aufnahme von Proteinen aus der ULF verantwortlich sein könnte, wurde durch BIAcore Analysen untersucht, ob Bestandteile der ULF zu Megalin binden. Wenn Megalin ein Rezeptor für einen oder mehrere Bestandteile aus der ULF ist, sollte auch ein Fehlen von Megalin im Uterus Auswirkungen auf die Zusammensetzung der Proteine in dieser Flüssigkeit haben. In der Regel kann man beim Fehlen eines Endozytoserezeptors mit einer Akkumulation von Liganden rechnen, da diese nicht mehr in das Gewebe aufgenommen werden können. In der folgenden Abbildung 4.38. sind in Teil **A** vergleichend die ULF von hormonell synchronisierten Wildtyp und Megalin Knockout Mäusen abgebildet. Die ULF (10 µg Gesamtprotein) wurden in einer 4-10 % SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel wurde mit Coomassie gefärbt.

Teil **B** der Abbildung zeigt die BIAcore Analysen der ULF von hormonell synchronisierten Wildtyp Mäusen.

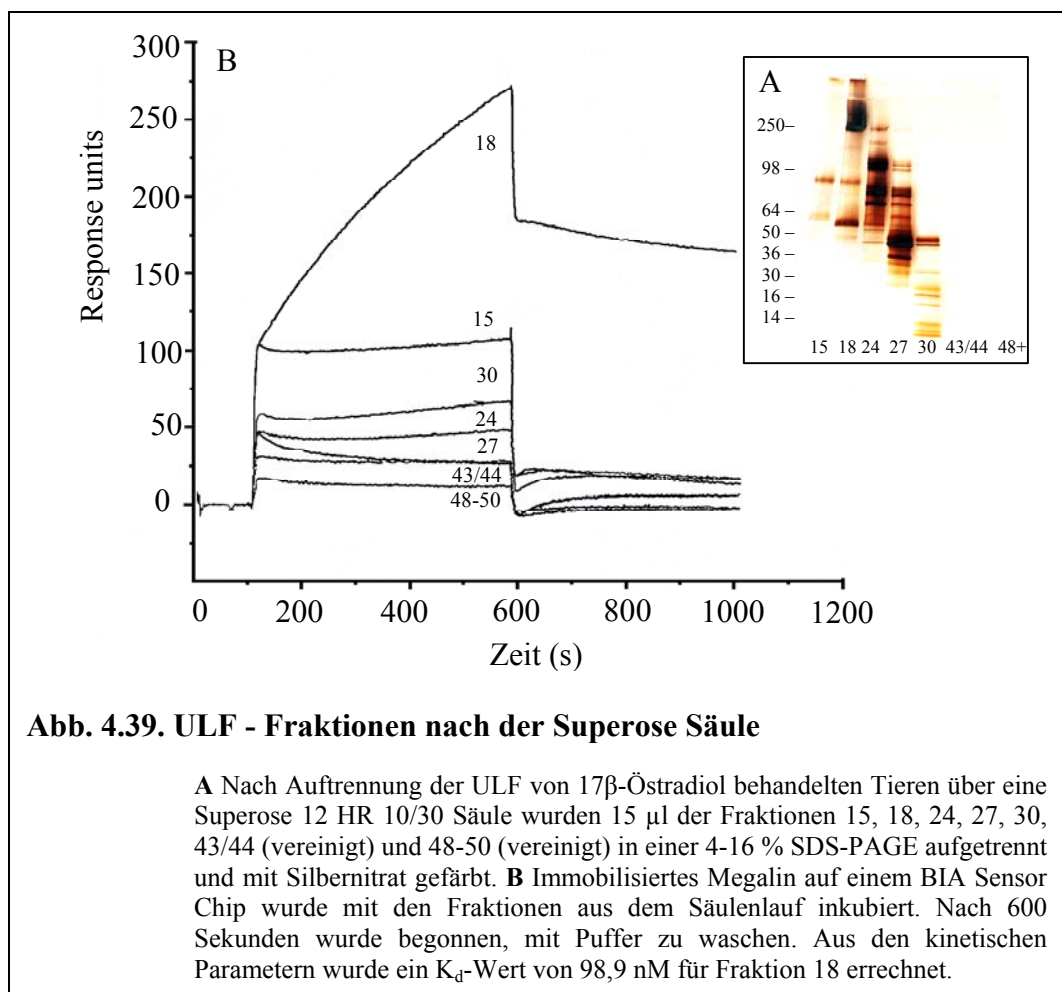


Bei Betrachtung der Coomassie gefärbten Proteinmuster in den beiden Phasen des Zyklus fällt keine offensichtlicher Unterschied zwischen den Wildtyp und den Megalin defizienten Mäusen auf. Weder in der Proliferations-, noch in der sekretorischen Phase kommt es zur Akkumulation oder Reduktion eines Proteins bei den Knockout Tieren. Das Bindungsverhalten der ULF von Wildtyp Mäusen (Abb. 4.38. B) und das von Megalin Knockout Mäusen (nicht abgebildet) ist identisch. In der oberen Kurve zeigt die ULF von 17β-Östradiol behandelten Tieren (sowohl Wildtyp, als auch Megalin Knockout Maus) eine Bindung an Megalin von knapp 600 Response Units. Es konnte jedoch im Vergleich kaum eine Bindung der Progesteron/17β-Östradiol induzierten ULF oder der

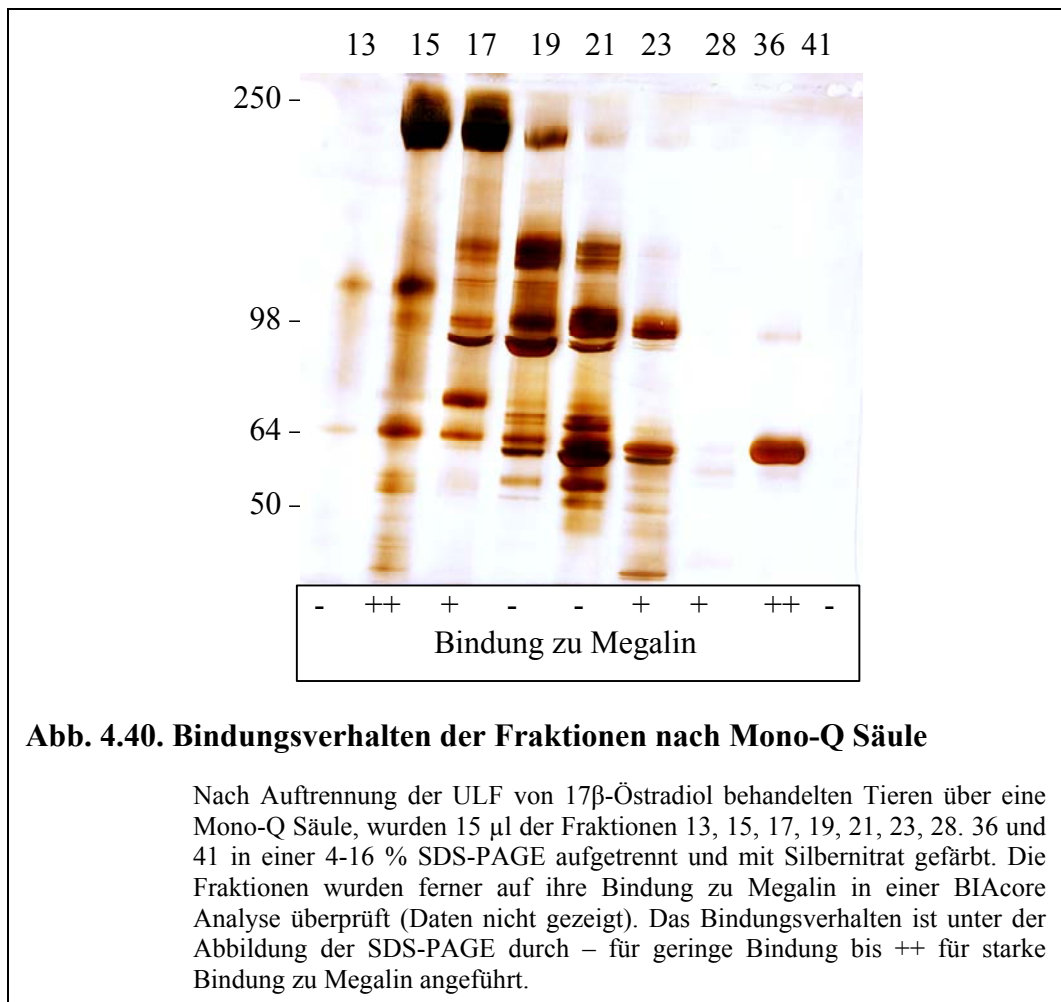
Kontrolltier ULF beobachtet werden. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in der Proliferationsphase es einen Bestandteil in der ULF gibt, der an Megalin in der BIAcore Analyse bindet. Dieses Protein ist bei Wildtyp und Megalin defizienten Tieren gleichermaßen vorhanden. Es wurde weder eine nennenswerte Ansammlung, noch ein Fehlen eines Bestandteils der ULF beobachtet.

4.8.3. Aufreinigung und Identifizierung des Megalin bindenden Proteins

Zur Identifizierung des an Megalin bindenden Bestandteils der ULF in der Proliferationsphase wurde von 17 β -Östradiol behandelten Tieren die ULF gesammelt. Diese wurde durch Gel-Filtration über eine Superose Säule aufgereinigt und die erhaltenen Fraktionen wurden auf ihr Bindungsverhalten zu Megalin durch BIAcore Analyse überprüft. Zusätzlich wurden je 15 μ l der Fraktionen in einer 4-16 % SDS-PAGE aufgetrennt und mit Silbernitrat gefärbt.



Wie in Abb. 4.39. zu sehen ist, zeigen die verschiedenen Fraktionen sowohl verschiedene Proteinmuster (A), als auch stark von einander abweichende Bindungsverhalten zu Megalin (B). Da Bestandteile in Faktion 18 Bestandteile besonders stark zu Megalin binden, wurde diese für eine weitere Aufreinigung ausgewählt. Abbildung 4.39. A zeigt, dass die Faktion 18 noch aus einem Gemisch von zahlreichen Proteinen bestand. Faktion 18 wurde deshalb durch einen Lauf über eine Mono-Q Säule weiter aufgereinigt. Die gesammelten Fraktionen dieser Chromatographie wurden wieder auf ihr Bindungsverhalten zu Megalin durch eine BIAcore Analyse überprüft (Daten hier nicht gezeigt). Gleichzeitig wurden wiederum je 15 µl der Fraktionen in einer 4-16 % SDS-PAGE aufgetrennt und mit Silbernitrat gefärbt, um sie auf ihre Reinheit zu überprüfen (Abb.4.40.).



In Fraktion 36 der ULF Aufreinigung über eine Mono-Q Säule fand sich ein 70-80 kDa großes Protein, dass stark zu Megalin bindet. In Fraktion 15 befanden sich ebenfalls Bestandteile, die eine Bindung zu Megalin zeigten, jedoch setzte sich Fraktion 15 aus einem Proteingemisch zusammen, so dass für eine Identifizierung des Megalin bindenden Bestandteils eine weitere Aufreinigung nötig gewesen wäre. Somit war das Protein in Fraktion 36 der erste Kandidat, der durch eine MALDI-MS sequenziert wurde. Die Sequenzierung ergab, dass das an Megalin bindende Protein aus der ULF von Mäusen in der Proliferationsphase das Eisenbindende Glykoprotein Laktoferrin ist. Dieses Ergebnis stimmt mit dem in der SDS-PAGE beobachteten Molekulargewicht des sequenzierten Proteins überein, da für Laktoferrin ein Gewicht von knapp 80 kDa angegeben wird (Aisen et al., 1980).

4.9. Laktoferrin

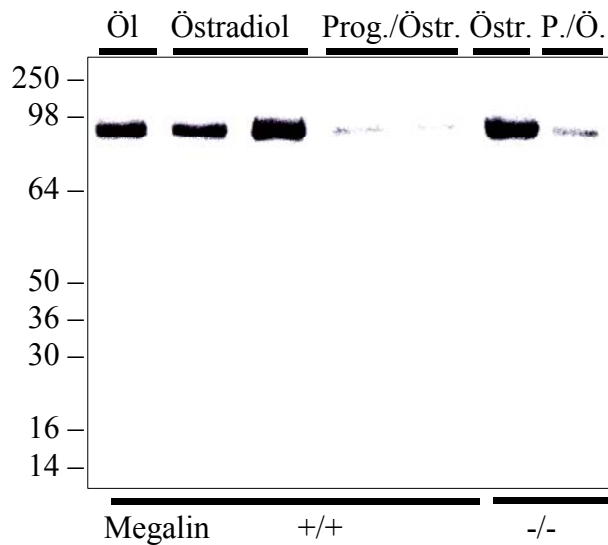
Laktoferrin gehört zur Transferrin Familie und wird von vielen Epithelien, meist in Drüsen, exprimiert und sekretiert (Yu et al., 1993, Pentecost et al., 1987, Masson et al., 1966b). Das Laktoferrin das Hauptprotein in ULF ist, welches durch 17β -Östradiol induziert wird, ist bekannt (Pentecost et al., 1987, Jefferson et al., 2000). Neben dem Eisentransport (Lyer et al., 1993) werden Laktoferrin unter anderem bakteriostatische, zellwachstumsfördernde, zelldifferentierende oder immunregulatorische Eigenschaften zugesprochen (Bullen et al., 1978, Nichols et al., 1987, Zimecki et al., 1995, Crouch et al., 1992).

4.9.1. Expression im Zyklus

Da Laktoferrin ein Ligand für Megalin in der murinen ULF ist, sollte als nächstes untersucht werden, ob ein Fehlen des Rezeptors im Uterus zur einer Akkumulation oder Herunterregulierung von Laktoferrin in der ULF führt. In dem mit Coomassie gefärbten Gel konnte zwischen den ULF von Wildtyp und Megalin Knockout Mäusen kein Unterschied ausgemacht werden, doch ist die Methode für diese Zwecke zu grob. Daher wurde erneut Wildtyp und Megalin Knockout ULF von hormonell synchronisierten Tieren in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran wurde mit einem Antikörper gegen Laktoferrin inkubiert.

Abb. 4.41. Western-Blot**Analyse der ULF von
Megalin Knockout
Mäusen und Wildtypen**

ULF von hormonell synchronisierten Tieren (10µg Protein) von Megalin Knockout Mäusen (-/-) und von Kontrolltieren (+/+) wurden in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt. Durch Western-Blot Analyse wurde Laktoferrin in den Proben dokumentiert.



Die Western-Blot Analyse der Wildtyp-ULF aus der Proliferationsphase (Abb.4.41.) zeigt erwartungsgemäß mehr Laktoferrin als die ULF, die während der sekretorischen Phase gewonnen wurde. Vergleicht man jedoch die Menge an Laktoferrin die sich in der ULF von Wildtyp Mäusen befindet mit der von Megalin defizienten Tieren, so ist kein Unterschied auszumachen. Es kommt in der Tat nicht zu einer Anreicherung von Laktoferrin aufgrund des fehlenden Rezeptors im Uterus. Es kann lediglich festgestellt werden, dass Laktoferrin zu Megalin bindet, es aber keine quantitativen Auswirkungen durch ein Fehlen des Rezeptors in hormonell synchronisierten Tieren gibt.

Welche Funktion Megalin im Stoffwechsel von Laktoferrin oder im Uterus ausüben könnte ist aber weiterhin unklar.

4.9.2. Funktion von Laktoferrin im Uterus

Laktoferrin wurde beschrieben als *trans*-aktivierendes Protein, das nach seiner Aufnahme in den Nukleus mittels Stress aktivierter Mitogen-aktivierter Proteinkinase (MAPK) und AP-1 DNA - Bindungsstellen im Gen von Matrix-Metalloproteinase 1 (MMP1) die Transkription des Gens einleitet (Oh et al., 2001). Das murine Homolog zum humanem MMP1 nennt sich MCOL A (murine Collagenase-like A), die cDNAs der beiden Proteine sind zu 74 % identisch. MCOL A fungiert als interstitielle Kollagenase und spielt beim Ab- und Umbau

von Geweben eine wichtige Rolle (Balbin, et al., 2001). Die Hauptexpression von MCOL A findet während der Embryogenese statt. MCOL A wird sowohl vom Embryo selbst, als auch von der Plazenta gebildet.

Um zu untersuchen, ob die Aktivierung des Gens für MMP1 durch Laktoferrin auch in der Maus funktioniert, wurde die MCOL A - mRNA Expression der Gebärmutter in der Proliferations- und in der sekretorischen Phase untersucht. Wäre die Theorie korrekt, dass MCOL A durch ein Signal von Laktoferrin hochreguliert wird, sollten während der Proliferationsphase größere Mengen MCOL A im Uterus zu finden sein. Wäre ferner die Theorie korrekt, dass Laktoferrin durch Megalin in die Zellen des Uterusepithels gelangt, sollten Uteri, denen der Rezeptor fehlt, weniger MCOL A - mRNA bilden. Für diesen Zweck wurden Wildtypmäuse hormonell synchronisiert und nach vier Tagen Hormoninjektionen die Uteri entnommen. Die mRNA wurde aus den Geweben gewonnen. Von der mRNA wurde cDNA hergestellt und mit der Methode der TaqMan[®]-PCR wurde die MCOL A - mRNA quantifiziert. Mit in den Versuch wurde eine mit Östradiol behandelte Megalin Knockout Maus aufgenommen. Während der sekretorischen Phase sollten aufgrund der hohen Konzentrationen an Laktoferrin in der ULF am leichtesten Auswirkungen auf die MCOL A mRNA Menge auszumachen sein.

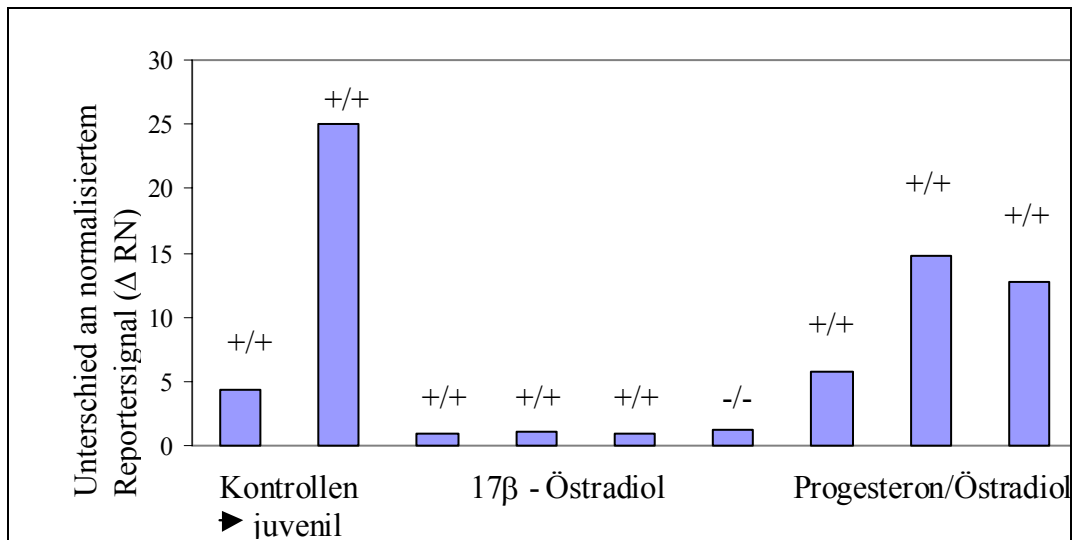


Abb. 4.42. TaqMan®-PCR zur Quantifizierung von MCOL A im Uterus, dem murinen Homolog zu MMP1

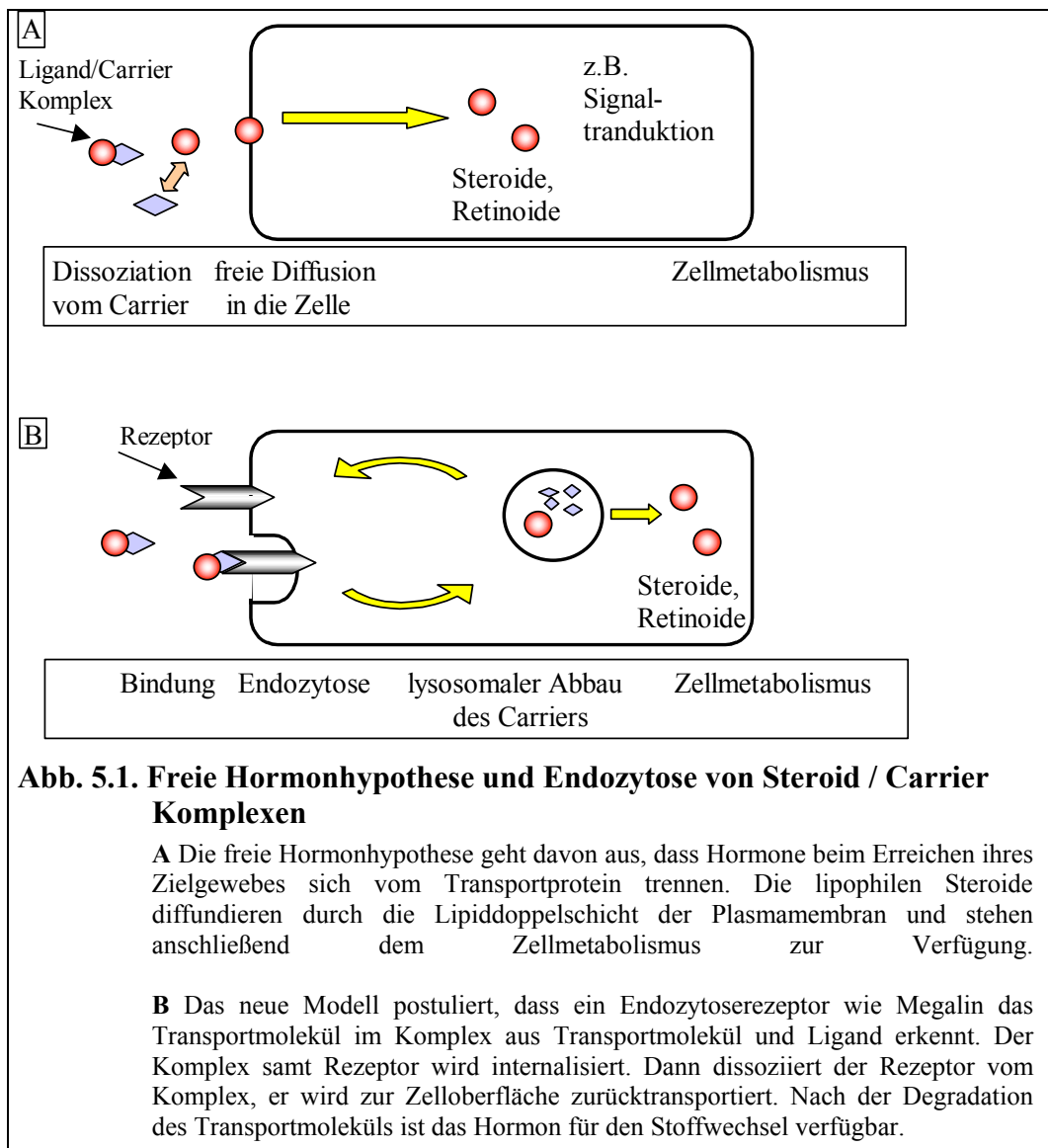
Als Ergebnisse der TaqMan®-PCR werden Unterschiede des normalisierten Signals zum kleinsten, gemessenen Wert angegeben. Für die noch juvenilen Kontrolltiere wurde ein durchschnittliches Δ RN von 14,7 gemessen, allerdings mit einer hohen Standardabweichung, für die 17 β -Östradiol behandelten Tiere ein Δ RN von 1,1, wobei für das Megalin defiziente Tier 1,3 gemessen wurde und für die Progesteron/Östradiol behandelten Tiere ein Δ RN von 11,0.

Sowohl juvenile Tiere, als auch Mäuse, die sich in der sekretorischen Phase des Zyklus befinden, haben im Vergleich zu Tieren in der Proliferationsphase höhere Mengen an MCOL A - mRNA im Uterusgewebe (Abb.4.42.). Diese Östradiol behandelten Tiere bilden unabhängig einer Megalin Expression im Uterusepithel kaum mRNA für MCOL A. Es bleibt zusammenzufassen, dass das murine Homolog für humanes MMP1 MCOL A nicht durch hohe Dosen Laktoferrin in der Expression hochreguliert wird. Im Gegensatz zu humanem MMP1 verhält es sich vielmehr andersherum. Bei hohen Mengen Laktoferrin im Uterus wird die mRNA für MCOL A in der Maus offenbar herunterreguliert. Ob die Transkription durch Laktoferrin inhibiert wird, kann nicht gesagt werden.

Es bleibt Spekulation, ob Laktoferrin bei der Maus über Megalin in die Epithelzellen aufgenommen wird. In die Signalkaskade, die MCOL A reguliert, ist Megalin aber wahrscheinlich nicht eingebunden.

5. DISKUSSION

Viele wichtige Funktionen im Körper sind von lipophilen Hormonen abhängig. Beispielsweise die optische Wahrnehmung, die sexuelle Reifung und Reproduktion oder der Aufbau von Knochen stehen in Abhängigkeit von Steroiden und Retinoiden. Bisher wurde die Aufnahme dieser lipophilen Moleküle in ihre Zielgewebe durch die „freie Hormonhypothese“ (Abb.5.1. A) erklärt. Die Hypothese geht davon aus, dass lipophile Hormone durch passive, freie Diffusion in ihre Zielzellen gelangen. Die im Serum gebundenen Transportproteine regulieren lediglich die Menge und Verfügbarkeit an freien Hormonen.



Neuere Untersuchungen zeigten, dass lipophile Hormone auch durch den Endozytoserezeptor Megalin aufgenommen werden können. Arbeiten mit Vitamin D, Vitamin B₁₂ und Vitamin A zeigen, dass diese Vitamine in die Zellen des proximalen Tubulus der Niere keinesfalls durch freie Diffusion gelangen, sondern dass es sich vielmehr um einen spezifische Aufnahmemechanismen handelt (Moestrup et al., 1996, Nykjaer et al., 1999, Christensen et al., 1999). Nach diesem vorgeschlagenen Modell (Abb.5.1.B) geschied die Aufnahme lipophiler Hormone durch Endozytose, analog zur Aufnahme von Lipoproteinen. Zielgewebe exprimieren Endozytoserezeptoren wie z.B. Megalin. Wie bei der Aufnahme von Lipoproteinen ist es der Proteinanteil im Komplex aus Hormon und Transportprotein, der an den Rezeptor bindet, dieses führt zur Internalisierung und der Proteinanteil wird in der Zelle degradiert. Die lipophilen Hormone können metabolisiert werden.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde versucht, dieses neue Modell der Hormonaufnahme weitergehend zu untersuchen und es sind tatsächlich Schritte gelungen, die als weitere Verifizierung des Modell gelten. Im experimentellen Teil wurden zwei Strategien verfolgt. Es werden zunächst die Ergebnisse diskutiert, die im Ergebnisteil den Abschluss bildeten, der Analyse des Megalin exprimierenden Uterus. Anschließend werden mit Apo D und CCSP zwei weitere Carrierproteine für lipophile Hormone vorgestellt, die durch Megalin vermittelte Endozytose von Zellen aufgenommen werden.

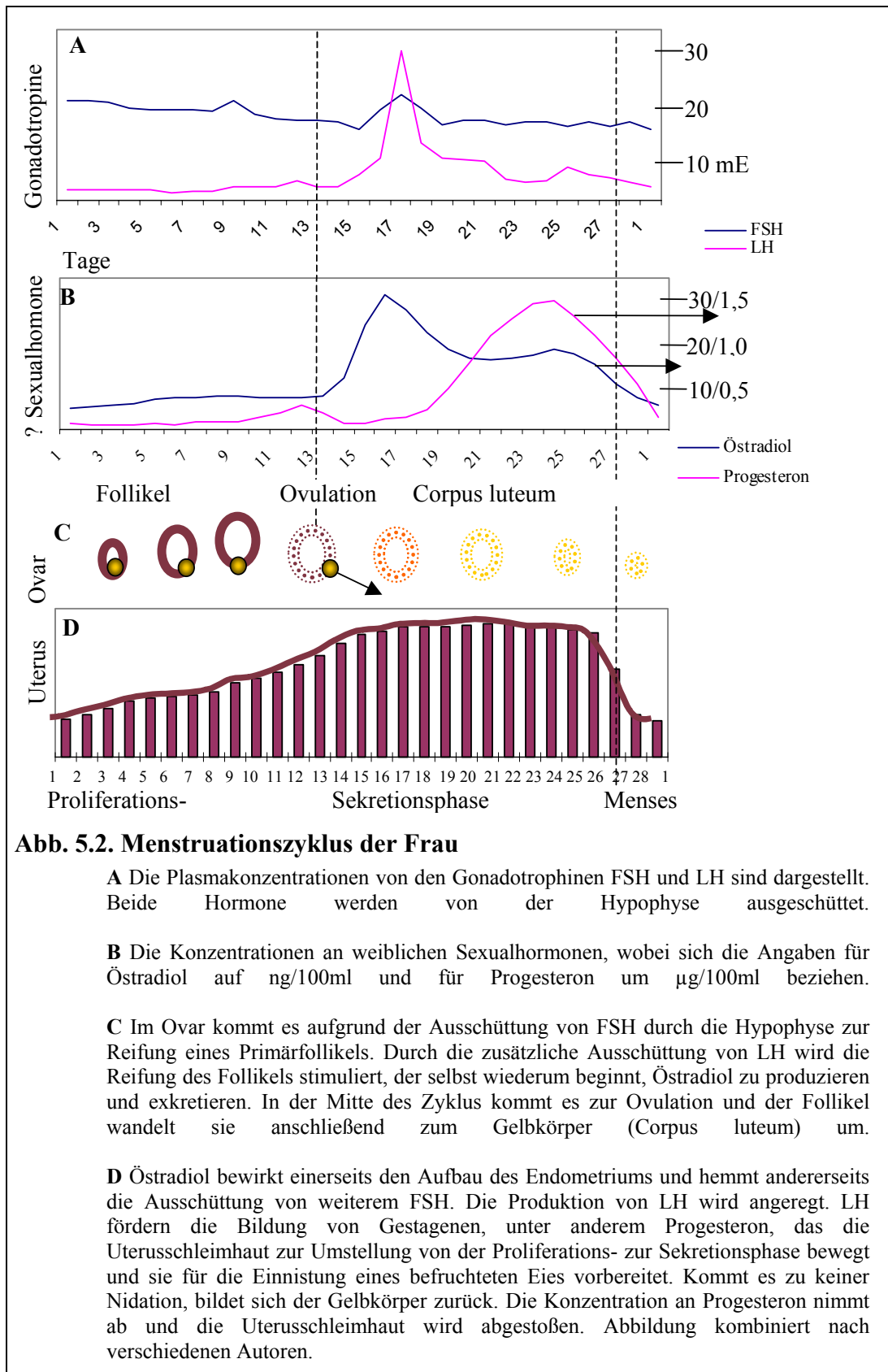
5.1. *Megalin im Uterus*

Die Bedeutung der durch Megalin vermittelten Aufnahme lipophiler Hormone spiegelt sich vielfältig im Phänotyp der Megalin Knockout Maus wieder. So entwickeln Megalin Knockout Mäuse aufgrund ihres ständigen Verlusts von Vitamin D über den Urin eine erhebliche Knochenerweichung (Osteomalazie) (Nykjaer et al., 1999). Wildtyp Mäuse gewinnen Vitamin D im Komplex mit seinem Carrierprotein DPB im proximalen Tubulus der Niere aus dem Primärharn zurück.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die sexuelle Reifung bei Megalin Knockout Weibchen gestört ist. Bei 60 % der Tiere kommt es zu keiner Öffnung der Vagina,

einem Östradiol abhängigem Vorgang. Bei Wildtyp Mäusen ist eine Megalin Expression ab der ersten Woche nachweisbar (Abb.4.29. **A, B**), die Vagina öffnet sich bei ihnen mit dem Erreichen der Geschlechtsreife in der dritten bis vierten Woche nach der Geburt. Arbeiten von Annette Hammes und Robert Spoelgen aus dem Labor von Thomas Willnow haben gezeigt, dass nicht nur bei weiblichen Megalin Knockout Mäusen die Geschlechtsentwicklung gestört ist. Bei den Männchen senken sich die Hoden nicht aus der Leibeshöhle in das Scrotum herab (persönliche Kommunikation). Dieser Vorgang ist abhängig von Testosteron. Als weiteres Indiz für die Bedeutung von Megalin für den Metabolismus von lipophilen Hormonen/Steroiden ist die regulierte Expression von Megalin in dem steroid-abhängigen Uterus. Während der frühen Entwicklung des Uterus ist Megalin ab der ersten Woche stark exprimiert. Diese Expression nimmt mit zunehmenden Alter ab, bleibt jedoch über die Geschlechtsreife hinaus erhalten. Bei geschlechtsreifen Weibchen ist sowohl Menge, als auch Verteilung von Megalin im Uterus vom Zyklus und damit vom Hormonstatus der Tiere abhängig. Eine Maus durchläuft mit 8 ± 3 Tage im Vergleich zum Menschen (28 ± 3 Tage) den Zyklus sehr viel schneller. Doch auch wenn der Zeitrahmen gerafft ist, sind es die gleichen Hormone, die steuernd wirken. In Abb. 5.2. ist exemplarisch der Ablauf mit den wichtigsten Hormonen zusammengefasst. Es kommt zur periodischen Reifung von Follikeln im Ovar und zu einer Veränderungen der Uterusschleimhaut (Endometrium). Bei hohen FSH (Follikel stimulierendes Hormon)-Konzentrationen im Plasma reifen Primärfollikel im Ovar. In der Mitte des Zyklus beginnt eine Ausschüttung von LH (luteinisierendes Hormon) durch die Hypophyse. Die reifenden Follikel wiederum bilden Östradiol. Bei einem bestimmten Konzentrationsverhältnis zwischen FSH und LH kommt es zur Ovulation, der Follikel wird zum Corpus luteum. Durch Östradiol wird das Endometrium zum Wachstum angeregt (Proliferationsphase). Die Hypophyse sekretiert verstärkt LH. LH regt wiederum die Bildung von Gestagenen an, unter ihnen Progesteron. Durch Progesteron geht der Uterus in die Sekretionsphase über und ist bereit für die Einnistung eines befruchteten Eies (Nidation). Kommt es zu keiner Nidation, bildet sich der Gelbkörper zurück und die Produktion von

Progesteron wird gedrosselt. Daraufhin kann die Uterusschleimhaut nicht aufrechterhalten werden und wird abgestoßen.



Trotz der hohen Komplexität des Menstruationszyklus lassen sich die Proliferations- und Sekretionsphase im Tierversuch bei Mäusen durch wiederholte Hormoninjektionen simulieren.

Im juvenilen Uterus weisen sowohl die Drüsen, als auch das luminale Epithel eine starke Expression von Megalin auf. Im Vergleich dazu ist die Expression von Megalin während der durch 17β -Östradiol induzierten Proliferationsphase im Wesentlichen auf Vesikel im Stroma beschränkt. In der sekretorischen Phase aber bewirkt die gleichzeitige Präsenz von Progesteron- und Östradiol einen Wiederanstieg der Megalin Expression. Wie bei juvenile Mäusen, jedoch deutlich schwächer, wird Megalin während der Sekretionsphase in Drüsen und vom luminale Epithel exprimiert. Diese histologischen Befunde decken sich mit der Quantifizierung von Megalin mRNA durch TaqMan[®]-PCR. Die Menge an Megalin Transkripten im Uterus war in juvenilen Mäusen am höchsten, gefolgt von mit Progesteron und Östradiol stimulierten Tieren. Bei Mäusen, die sich in der Proliferationsphase befanden, konnten nur geringe Mengen an Megalin mRNA im Uterus detektiert werden.

Die Zusammensetzung der ULF spiegelt die vom Zyklus abhängige Expression von Proteinen wieder. Deutliche Unterschiede im Proteinmuster der ULF während der Sekretions- und der Proliferationsphase sind in den Abb. 4.37 und 4.38 A zu erkennen. Eines der in der Proliferationsphase hochregulierten Proteine wurde als potentieller Ligand für Megalin im Uterus identifiziert.

Es handelt sich um das Glykoprotein Laktoferrin. Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Arbeiten überein, welche von einer durch Östradiol induzierbaren Expression von Laktoferrin (Pentecost et al., 1987, Jefferson et al., 2000), sowie von einer Bindung des Proteins an Megalin (Willnow et al., 1992) berichten. Laktoferrin besitzt die Eigenschaft, Eisen zu binden und greift in eine Reihe vorwiegend immunologischer Prozesse ein (Aisen et al., 1980).

Es ist demonstriert worden, dass Laktoferrin von Zellen aus dem Serum aufgenommen und in den Nukleus transportiert werden kann (Garre et al., 1992). Im Zellkern bindet Laktoferrin zur DNA und fungiert als Transkriptionsfaktor (Penco et al., 2001).

Die postulierte Arbeitshypothese war, dass eine zelluläre Aufnahme von Laktoferrin aus dem Serum oder anderen Körperflüssigkeiten wie der ULF durch Megalin erfolgt. Interessanterweise ist eines der Zielgene, welches durch Laktoferrin hochreguliert wird, das Gen für die Collagenase MMP1 (Oh et al., 2001). Als ein die extrazelluläre Matrix degradierendes Enzym ist MMP1 an einer ganzen Reihe physiologischer Prozesse beteiligt, die einen Umbau von Bindegewebe voraussetzen (Birkedal-Hansen, 1995). Dazu gehören neben Wundheilung, Implantation und Embryonalentwicklung (Qin et al., 1997), auch Auf- und Abbau des Endometriums während des Menstruationszyklus (Rawdanowicz et al., 1994).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Megalin Expression während des Zyklus hoch- und herabreguliert wird (Abb. 4.31- 4.34). Da Laktoferrin Bestandteil der ULF ist, könnte eine geregelte MMP1 Expression im Uterus von Megalin abhängig sein. Als wahrscheinlichster Kandidat für ein murines MMP1 Homolog gilt bisher MCOL A (Balbin et al., 2001). Es handelt sich dabei um eine ebenfalls im Uterus exprimierte Collagenase, deren cDNA zu 74% mit der cDNA der humanen MMP1 übereinstimmt. In weiblichen Mäusen gleicht die Auf-Abregulation von MCOL A dem Expressionsmuster von Megalin (Abb. 4.34 und Abb. 4.42). Die Anzahl an Transkripten ist bei juvenilen Tieren am größten. Bei geschlechtsreifen Weibchen wird sowohl Megalin, als auch MCOL A in nennenswerten Mengen nur während der sekretorischen Phase transkribiert. Während der Proliferationsphase, also zum Zeitpunkt der größten Expression von Laktoferrin in der ULF, wird kaum MCOL A mRNA im Uterus gefunden. Auch konnte während dieser Phase des Zyklus kein Unterschied in der Transkription der Collagenase zwischen Megalin Knockout Mäusen und Kontrolltieren bestimmt werden.

Damit stellt sich die Frage, warum hohe Konzentrationen von Laktoferrin nicht zu einer vermehrten Transkription von MCOL A führen. Bisher existieren keine Arbeiten, die von einer *trans*-aktivierenden Aktivität Laktoferrins auf MCOL A berichten. Es besteht folglich die Möglichkeit, dass im Gegensatz zu humanem MMP1, murines MCOL A nicht durch Laktoferrin aktiviert wird. Eine andere Erklärungsmöglichkeit liefert das Expressionsmuster Megalins während der

Proliferationsphase. Das Vorkommen des Rezeptors ist reduziert auf die Vesikel (Abb. 4.32.), eine luminale Expression im Endometrium hingegen ist nicht mehr nachweisbar. Laktoferrin kann folglich in der Proliferationsphase nicht mehr durch Megalin aus der ULF aufgenommen werden. Unter der Voraussetzung, dass ausschließlich Megalin für die zelluläre Aufnahme Laktoferrins verantwortlich ist, könnte MCOL A nicht mehr aktiviert werden. In diesem Fall sollte sich während der Sekretionsphase in Megalin defizienten Mäusen nur eine geringe Transkription von MCOL A im Gegensatz zu Wildtyp Tieren nachweisen lassen. Da Megalin Knockout Weibchen äußerst selten überleben, konnten diese Experimente bisher noch nicht durchgeführt werden.

Megalins Aufgabe im Uterus könnte auch die Endozytose anderer Proteine sein. So wird neben Laktoferrin auch Apolipoprotein J/Clusterin, ein weiterer Ligand von Megalin, in uterinen Sekreten vorgefunden (Kounnas et al., 1995, Brown et al., 1995). Apolipoprotein J/Clusterin ist ein 75-80 kDa großes Heterodimer, welches in vielen Organen produziert wird und dann meist sekretiert wird. In einer ganzen Reihe von Körperflüssigkeiten ist Apolipoprotein J/Clusterin vorzufinden, wie z.B. der Muttermilch und der ULF (Jones et al., 2002, Kounnas et al., 1995). In Mäusen ist die Expression von Apolipoprotein J/Clusterin wie die Megalins abhängig vom Hormonstatus der Tiere. Injektionen von nur Östradiol oder nur Progesteron führen nicht zu vermehrter Produktion von Apolipoprotein J/Clusterin mRNA. Eine Vorbehandlung mit Östradiol, gefolgt von Progesteron-Injektionen bewirken hingegen einen massiven Anstieg an Protein (Brown et al., 1995). Dieser Hormonstatus ist typisch für die Situation, die wir in der späten sekretorischen Phase vorfinden. Abb.5.2. zeigt, dass nach dieser Phase meist die Menses folgt, also eine komplette Neuorganisation des Uterusepithels. In der Tat ist Apolipoprotein J/Clusterin für Umstrukturierungsprozesse des Gewebes wichtig. Das Protein gilt als extrazellulärer „Zellschutz“, der die bei der Lyse von Zellen anfallenden Gewebsreste bindet und beseitigt (Brown et al., 1995). Megalin wird ebenfalls vermehrt in der Sekretionsphase exprimiert (Abb. 4.34.), vielleicht mit der Aufgabe, Apolipoprotein J/Clusterin zu binden und internalisieren. Interessanterweise bilden Karzinomazellen des Endometriums

sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* vermehrt Apolipoprotein J/Clusterin nach Östradiol-Stimulation (Wunsche et al., 1998).

Obwohl diese physiologischen Daten das Modell der Rezeptor vermittelten, zellulären Aufnahme von lipophilen Hormonen im Komplex mit spezifischen Transportmolekülen nicht direkt unterstützen, sind sie doch ein wichtiger Beleg für die Bedeutung von Megalin für die Entwicklung und Funktion steroid-abhängiger Gewebe, hier dem Uterus. Direkte Unterstützung für die Richtigkeit des Modells ist die Identifizierung zweier Transportproteine für Steroide (Apo D und CCSP), die durch Megalin vermittelter Endozytose von Zellen aufgenommen werden.

5.2. Apo D

Apo D ist multifunktionelles Transportprotein für zahlreiche Liganden, welches zur Proteinfamilie der Lipocaline gehört (Rassart et al., 2000, Åkerstrom et al., 2000). Die Lipocaline RBP, α_1 -M (α_1 -Mikroglobulin) und OBP (Odorant-bindendes Protein) sind bereits als Liganden für Megalin identifiziert worden (Christensen et al., 1999, Leheste et al., 1999). Apo D ist überwiegend mit high density lipoprotein (HDL)-Partikeln im Plasma assoziiert (McConathy and Alaupovic, 1973).

In der vorliegenden Arbeit ist gezeigt worden, dass Apo D zu Megalin bindet (Abb. 4.8.) und in Megalin exprimierende Zellen aufgenommen und degradiert wird (Abb. 4.9 und 4.10). Diese Daten verifizieren neuere Berichte, die HDL-Partikel als Liganden für Megalin beschreiben (Hammad et al., 2000, Kozyraki et al., 2001). Es ist also durchaus möglich, dass diese Interaktion zwischen HDL-Partikeln und Megalin von Apo D vermittelt wird. Apo D bindet unter anderem Bilirubin, Arachidonsäure (Peitsch et al., 1989, Morais-Cabral et al., 1995) und Progesteron (Pearlmann et al., 1973, Dilley et al., 1990).

Die Aufklärung der Aufnahmemechanismen von Steroiden ist von besonderer medizinischer Bedeutung. Steroidhormone spielen eine herausragende Rolle in der Wachstumsregulation hormonsensitiver Tumore, die immerhin für ein Drittel aller menschlichen Krebserkrankungen verantwortlich sind (Labrie et al., 1986, Davidson et al., 1989, Boring et al., 1991). Besonders in der Entstehung und

Progression von Brust- und Prostatakrebs wird eine Rolle für Apo D diskutiert (Sanchez et al., 1992a und b, Aspinall et al., 1995). In überraschend vielen Tumoren apokriner Herkunft werden auffallend hohe Konzentrationen an Apo D gemessen.

In der Zystenflüssigkeit großer Zysten der Brust von Frauen, die unter Mastopathia cystica fibrosa leiden, kann Apo D über 50% der Gesamtproteinmenge ausmachen (Balbin et al., 1990). Es kann zu einer 1000fach höheren Konzentration von Apo D im Vergleich zum Plasma kommen. Auch wenn aus diesen Zysten selbst keine Tumore hervorgehen, besteht für die betroffenen Frauen ein zwei- bis vierfach erhöhtes Risiko, an Brustkrebs zu erkranken (Balbin et al., 1990, Sanchez et al., 1992a). Weiterhin gilt für Brustkrebserkrankungen, dass die Apo D Expression höher in differenzierten Karzinomen ist, als in undifferenzierten, aggressiven Tumoren (Sanchez et al., 1992 a und b). Die Konzentration von Apo D wird daher als Marker für die Tumorprogression angesehen (Diez-Itza et al., 1994). Eine hohe Apo D Expression in Brustkarzinomen verringert bei betroffenen Frauen die Chancen eines Rückfalls und steigert ihre Überlebenschancen. Bei Prostatakrebs hingegen ist die Apo D Expression in gutartigen Tumoren nur leicht, in malignen Karzinomen stark im Vergleich zum Normalwert erhöht.

Die Megalin vermittelte Aufnahme und Degradation von rekombinant hergestelltem Apo D konnte im Zellkulturversuch dokumentiert werden (Abb. 4.10). Mit dieser Arbeit konnte jedoch keine durch Apo D vermittelte Steroidaufnahme in Megalin exprimierende Zellen gezeigt werden.

In der Tat scheint die Kopplung von Progesteron an sein Transportprotein Apo D schwierig zu sein und es werden selbst unter Verwendung nativen Apo D aus Zystenflüssigkeit nur geringe Ausbeuten an Komplex erzielt (Dilley et al., 1990). Das Unvermögen von Megalin exprimierender Zellen, Apo D im Komplex mit Progesteron aufzunehmen (Abb. 4.11.), mag also daran liegen, dass die Komplexbildung höchst mangelhaft war, auch wenn sie anfangs aufgrund hoher Ausbeuten im Vergleich zu veröffentlichter Literatur erfolgreich aussah (Dilley et al., 1990). Die plausibelste Erklärung ist, dass Progesteron außen am Lipocalin die Bindungsstellen zu Megalin besetzte, statt die Ligandenbindungsdomäne des

Proteins zu belegen. Eine weitere Bindung des vermeintlichen „Komplexes“ zum Rezeptor und eine anschließende Aufnahme in die Zellen konnte nicht mehr stattfinden. Die drei unabhängigen Studien, mittels BIAcore Analyse (Abb. 4.8.), in der Liganden Blot Analyse (Abb. 4.9.) und die wiederholten Apo D-Aufnahme und Degradation Versuche durch BN 16 Zellen (Abb. 4.10.) geben eine klare Auskunft, dass Apo D an Megalin bindet.

Es konnte außer der Bindung von Apo D an Megalin auch eine in der Affinität vergleichbare Bindung an VLDL R festgestellt werden (Abb. 4.8.). Sowohl Megalin, als auch VLDL R werden im Brustgewebe exprimiert (Lundgren et al., 1997, Simonsen et al., 1994). Doch es ist der VLDL R, der in Brustkrebsgewebe gefunden wird, hier spezifisch in den Epithelzellen (Martensen et al., 1997, Webb et al., 1999 und 2001). Leider konnte aufgrund des Fehlens einer VLDL R exprimierenden Zelllinie dieser erfolgversprechende Weg nicht weiter durch *in vitro* Studien verfolgt werden.

Festzuhalten bleibt, dass Megalin Apo D, das Transportprotein für Progesteron und eine Reihe anderer Steroidhormone, *in vitro* bindet und aufnimmt.

5.3. CCSP

In der vorliegenden Arbeit habe ich die für die Aufnahme von CCSP im proximalen Tubulus der Niere verantwortlichen Rezeptoren identifiziert. Die Existenz solcher Rezeptoren wurde postuliert aufgrund der Aufnahme von CCSP und CCSP im Komplex mit PCBs in die Niere (Brandt et al., 1985, Stripp et al., 1996). Für diese CCSP Aufnahme sind zwei zelluläre Rezeptoren erforderlich: Cubilin, ein peripheres Membranprotein, welches direkt an CCSP bindet und Megalin, ein Endozytoserezeptor, der für die Endozytose vom Komplex aus CCSP und Cubilin notwendig ist.

Cubilin wurde ursprünglich identifiziert und kloniert als Intrinsic Faktor-Rezeptor, ein Protein, welches im Endbereich des Dünndarms für die Aufnahme von IF/Vitamin B₁₂ verantwortlich ist (Seetharam et al., 1997, Birn et al., 1997, Sahali et al., 1988, Moestrup et al., 1998). In Übereinstimmung mit dieser entscheidenden Aufgabe in der Vitamin B₁₂ Aufnahme im Darm entwickeln Patienten mit einem Defekt im Gen für Cubilin (Imerslund-Gräsbeck Syndrom)

einen Vitamin B₁₂ Mangel und einer damit einhergehenden Anämie (Aminoff et al., 1999).

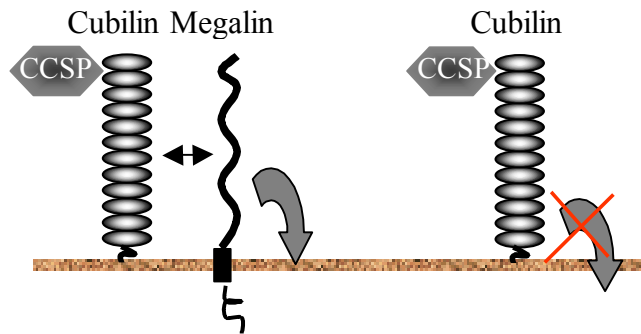
Außer im Endbereich des Dünndarms wird Cubilin in einer Reihe anderer Gewebe exprimiert, darunter im proximalen Tubulus der Niere und im Dottersack (Moestrup et al., 1998, Hammad et al., 2000). Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass das Protein in die Aufnahme von zusätzlichen Liganden in nicht gastro-intestinale Zellen involviert sein könnte. Im proximalen Tubulus wurde Cubilin als der Rezeptor identifiziert, der für die Resorption von filtriertem Albumin aus dem Primärharn verantwortlich ist (Birn et al., 2000). Ebenfalls ist seine Rolle in der Aufnahme von HDL-Partikeln beschrieben (Kozyraki et al., 1999, Hammad et al., 1999).

Mit seiner Funktion als Endozytoserezeptor mutet die Struktur von Cubilin ungewöhnlich an. Dem Protein fehlen sowohl eine Transmembran-, als auch eine zytoplasmatische Domäne. Es ist nur locker mit der Plasmamembran verbunden. Diese Verbindung wird durch eine amphipatische Helix hergestellt, die sich am aminoterminalen Ende des Proteins befindet (Kristiansen et al., 1999). Da Cubilin mit Megalin oft coexprimiert wird und diesen Rezeptor *in vitro* bindet, wurde ein Modell vorgeschlagen, in dem Cubilin an Megalin bindet, um gemeinsame Endozytose und ein Recycling an die Zelloberfläche zu durchlaufen (Moestrup et al., 1998).

Es wurden einige Liganden vorgeschlagen, welche diesen Corezeptor Mechanismus nutzen, inklusive IF (Moestrup et al., 1998), Albumin (Birn et al., 2000) und HDL (Hammad et al., 2000). Doch bisher sind keine Resultate publiziert worden, die zeigen, dass dieses „Rezeptoren-Doppel“ auch *in vivo* aktiv ist. In der vorliegenden Arbeit werden die ersten experimentellen Beweise beschrieben, dass Cubilin/Megalin als Rezeptoren-Doppel *in vivo* existent ist und im Zusammenspiel für die Aufnahme von CCSP in die proximalen Tubuli der Niere notwendig sind. Die Zusammenarbeit des Rezeptoren-Doppels sieht schematisch wahrscheinlich wie in Abb. 5.3. dargestellt aus.

**Abb. 5.3. Endozytose
von CCSP durch
Cubilin/Megalin**

Der Progesteroncarrier CCSP bindet direkt an Cubilin. Im Komplex mit CCSP bindet Cubilin an Megalin, welches die Endozytose des Gesamtkomplexes vermittelt. Ohne Megalin kommt es zu keiner Endozytose.



Eine Inhibierung von Cubilin in Zellkultur (Abb. 4.18.) oder eine genetische Inaktivierung im Patienten (Abb. 4.19.) verhindert die zelluläre Aufnahme von CCSP. Die gleichen Effekte werden beobachtet, wenn Megalin durch spezifische Antikörper inaktiviert ist (Abb. 4.18) oder das Gen, wie bei der Megalin Knockout Maus, fehlt (Abb. 4.20. und 4.21.).

Die Assoziation von Zelloberflächenproteinen mit Endozytoserezeptoren für eine gemeinsame Endozytose und ein Recycling an die Zelloberfläche sind bereits beschrieben worden. Häufig wurde dieses Phänomen bei Proteinen beschrieben, die durch Glykosyl-Phosphatidyl Inositol (GPI)-Anker mit der Plasmamembran verbunden sind. Ein Beispiel ist der Urokinase Rezeptor, der mit LRP in Verbindung tritt, um Liganden durch Endozytose in die Zellen zu bringen (Nykjaer et al., 1997). Beide Rezeptoren binden zueinander über einen gemeinsamen Liganden, dem Urokinase/Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 Komplex. Die Existenz eines Endozytosecorezeptors für das GPI-verankerte Prion Protein wurde vorgeschlagen (Harris, 1999). Das Cubilin/Megalin Rezeptoren-Doppel ist jedoch bisher einzigartig, da ein peripheres Membranprotein ohne GPI-Anker direkt an einen Endozytoserezeptor bindet.

In Abwesenheit von Megalin, wie z.B. in der Niere einer Megalin Knockout Maus, ist die Gesamtmenge an exprimiertem Cubilin auf der Zelloberfläche deutlich reduziert (Abb. 4.22., 4.23., 4.24.). Die wenigen Rezeptormoleküle, die dem Lumen des Tubulus zugewandt sind, können CCSP nicht durch Endozytose in die Zellen aufnehmen (Abb. 4.21.). Sie sind ferner nicht in Endosomen oder in

Vesikeln des Membranrecyclings auffindbar (Abb. 4.23). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Megalin in zwei unterschiedlichen Bereichen, nämlich dem Transports und der Funktion von Cubilin involviert ist. Zum einen ist Megalin wichtig, aber nicht essentiell für Cubilins Leitung durch den sekretorischen Weg zur Zelloberfläche. Zweitens ist Megalin absolut notwendig für eine Aufnahme Cubilins und eine Weiterleitung zu den Endosomen. Mit den Ergebnissen von Moestrup et al. (1998) und Hammad et al., (2000) kann ein Mechanismus postuliert werden, indem Cubilin überall mit Megalin assoziiert bleibt, sowohl während der Endozytose, als auch auf der Zelloberfläche. Liganden wie IF, Albumin oder CCSP assoziieren mit dem Komplex, indem sie zu Cubilin binden an Stellen, wo der Rezeptor nicht mit Megalin verbunden ist.

Aufgrund der geringen Affinität Cubilins zu CCSP war es technisch nicht möglich, einen Komplex aus Cubilin, Megalin und CCSP zu bilden. Doch die Formung eines solchen Komplexes mit IF als Liganden ist bereits gelungen (Moestrup et al., 1998).

Da die Expression von Megalin und Cubilin nicht auf die proximalen Tubuli der Niere beschränkt ist, drängt sich die Frage auf, ob das Rezeptoren-Doppel auch für die Akkumulation von CCSP in Geweben außerhalb der Niere verantwortlich ist. Und in der Tat decken sich jüngste Studien mit den hier vorgestellten Ergebnissen. So werden in der Lunge die beiden Rezeptoren von Type II Pneumozyten exprimiert. Mit höchster Wahrscheinlichkeit ist hier das Rezeptoren-Doppel aus Megalin und Cubilin verantwortlich für die zelluläre Aufnahme von HDL-Partikeln und somit von Vitamin E in das Lungengewebe (Kollek et al., 2002). Mit dieser Arbeit kann jedoch kein Beweis vorgelegt werden, dass CCSP durch diesen Mechanismus in das respiratorische Epithel aufgenommen wird (Abb. 4.25 und 4.26), wie der unveränderte Metabolismus von CCSP in der Lunge Megalin defizienter Mäuse zeigt. Es bleibt anzumerken, dass in der vorliegenden Arbeit die Menge an CCSP in der bronchio-alveolaren Lavage mittels Western Blot Analyse untersucht wurde, eine Methode, die nur eine starke Veränderung in der Quantität eines Proteins zulässt.

Weitere Gewebe mit bewiesener Coexpression von Megalin und Cubilin sind der Dottersack und der Endbereich des Dünndarms (Hammad et al., 2000). Die

zelluläre Aufnahme von CCSP ist für die proximalen Tubuli der Niere und das Endometrium beschrieben worden (Bernard et al., 1994, Boeskanl et al., 1984, 1988). Interessant wäre daher eine eingehende Untersuchung, ob Cubilin in Zusammenarbeit mit Megalin CCSP in die Epithelzellen des Endometriums aufnehmen kann.

Die Identifikation eines Aufnahmemechanismus für die CCSP Resorption aus dem glomerulären Filtrat wirft einige interessante Hypothesen über die physiologische Rolle *in vivo* auf. Die Hauptfunktion von Megalin im proximalen Tubulus der Niere ist die Rückgewinnung von Plasmacarriern, die durch den Glomerulus filtriert wurden (zusammengefasst von Christensen und Willnow, 1999b). Diese Transportproteine sind DBP, RBP, Transcobalamin und Transthyretin. Die Resorption dieser Carrierproteine ist notwendig, um den Verlust von essentiellen Metaboliten wie Vitamin A, D₃, B₁₂ und Thyroxin durch die Ausscheidung mit dem Urin zu verhindern (Nykjaer et al., 1999, Christensen et al., 1999a, Sousa et al., 2000).

Die Rückgewinnung von CCSP auf demselben Wege lässt vermuten, dass dieses Protein ebenfalls als Carrier für wichtige Metaboliten fungiert und ein Verlust dieser vermieden werden sollte. Einhergehend mit dieser Hypothese wurde gezeigt, dass Progesteron in der Ligandenbindungsdomäne des CCSP Homodimers bindet (Dunkel et al., 1995). Ob Progesteron der Ligand für CCSP *in vivo* ist, liegt noch im Unklaren. Die Affinität des Steroidhormons zu den verschiedenen CCSP Spezies schwankt stark, so ist sie für das CCSP bei Mensch und Affe sehr gering. Daher wird angenommen, dass ein bisher unidentifizierter Ligand für CCSP existieren muss.

Cubilin defiziente Patienten und Megalin Knockout Mäuse sollten einen Verlust dieser Metaboliten über den Urin zeigen. Eine Funktion von CCSP im Transport und zellulärer Aufnahme von lipophilen Substanzen ist unterstützt durch die Rolle, die CCSP bei der Akkumulation von PCB zukommt. Es ist denkbar, dass diese lipophilen Xenobiotica die natürlichen endogenen Liganden aus der Bindungsdomäne von CCSP verdrängen und so in die Zielgewebe/-zellen gelangen, die normalerweise CCSP im Komplex mit seinem Liganden aufnehmen würden.

Die vorliegenden Untersuchungen über CCSP haben einen Aufnahmemechanismus für CCSP in die Niere nachgewiesen.

Neue Studien, die nach der Veröffentlichung dieser Arbeit über den Aufnahmemechanismus von CCSP erschienen sind, unterstützen die hier vorgestellten Ergebnisse. Inzwischen ist für weitere Liganden nachgewiesen worden, dass sie durch das Rezeptoren-Doppel aus Cubilin und Megalin in Zellen aufgenommen werden. Für die Aufnahme des Komplexes aus Transferrin und Eisen im proximalen Tubulus der Niere stellte sich ebenfalls heraus, dass die Rückgewinnung aus dem Primärharn durch Cubilin/Megalin stattfindet, wobei Transferrin ausschließlich an Cubilin bindet (Kozyraki et al., 2001). Der Komplex aus Vitamin D und seinem Carrierprotein DBP wird ebenfalls durch den Doppel-Rezeptorenmechanismus aufgenommen (Nykjaer et al., 2001). Dabei ist zu bemerken, dass DBP zu beiden Rezeptoren bindet. Es verlieren Hunde und Menschen mit einer Cubilin Defizienz geringere Mengen an Vitamin D im Urin als Megalin defiziente Mäuse. Wird Cubilin im proximalen Tubulus der Niere nicht exprimiert, kann der Vitamin D/DBP Komplex weiterhin an Megalin binden und so in die Zellen aufgenommen werden. Fehlt hingegen Megalin, findet keine Endozytose statt, auch wenn der Komplex an Cubilin bindet. Folglich wird Vitamin D mit dem Urin ausgeschieden. Für die zelluläre Aufnahme von Transcobalamin im Komplex mit Vitamin B₁₂ im proximalen Tubulus der Niere ist nach heutigen Kenntnissen Megalin allein verantwortlich, gleiches gilt für Vitamin A mit seinem Carrierprotein RBP. Cubilin scheint bei der Aufnahme dieser Vitamine in die Zellen des proximalen Tubulus der Niere keine Bedeutung zu haben.

Ausstehende Experimente:

Bei der Untersuchung zur Rolle Megalins in der Entwicklung des Uterus sind in noch viele Fragen offen. Erste Hinweise weisen auf einen wesentlichen Anteil des Rezeptors bei der sexuellen Reifung der weiblichen Maus hin, doch stehen detaillierte Erklärungen über die Wirkungsweise aus.

Die Analysen zur Interaktion zwischen Megalin und Apo D könnten durch die Studien zur Progesteronaufnahme vervollständigt werden, doch nach jetzigem Stand der Erkenntnis wäre eine eingehendere Untersuchung einer Apo D / Progesteronaufnahme durch den VLDL R sicherlich von weitreichenderer Relevanz.

Im Falle einer Verfügbarkeit von markierten PCBs im Komplex mit CCSP wäre ein abschließender Beweis der Einlagerung dieser Toxine in die Niere, bzw. dem Ausbleiben bei Megalin Knockout Mäusen oder Cubilin defizienten Hunden zu erbringen.

Weitergehende Studien, die zur Prävention einer PCB-Akkumulation in Lunge und Niere bei einer Exposition dienen, sind ohne Zweifel von medizinischer Bedeutung. Durch sogenanntes „Drugdesign“, also der maßgeschneiderten Synthese z.B. eines PCB-Antagonisten, könnte eine Aufnahme in den Körper verhindert werden. Der Rezeptor wäre durch das im Idealfall ungiftige Medikament blockiert, die krebserregende und fruchtschädigende Wirkung der PCBs wäre vermieden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Der Mechanismus der Endozytose von Lipoproteinen wurde hauptsächlich durch die Arbeiten am low density lipoprotein (LDL) Rezeptor (LDL R) aufgeklärt. Heute sind eine Reihe von strukturell und funktionell verwandten Rezeptoren bekannt, die mit dem LDL R eine Familie von Endozytoserezeptoren bilden, die LDL R Gen Familie. Es musste jedoch die anfängliche Annahme, dass diese Rezeptoren lediglich der zellulären Aufnahme von Lipoproteinen dienen, revidiert werden. Vielmehr gibt es deutliche Hinweise, dass das Wirkungsspektrum der Rezeptoren der LDL R Gen Familie außerdem Signaltransduktion, sowie Endozytose von Lipiden umfasst, die nicht in Lipoproteinp Partikeln transportiert werden. Unter anderem werden Steroide und Retinoide im Plasma im Komplex mit spezifischen Carrierproteinen transportiert. Mit dieser Arbeit sollten Beweise gesammelt werden, dass der Endozytoserezeptor Megalin für die Aufnahme lipophiler Substanzen im Komplex mit ihren Transportmolekülen in Zielgewebe verantwortlich ist. Es wurden exemplarisch drei Proteine (24p3, Apo D und CCSP) ausgesucht, die jeweils die Funktion eines Transportmoleküls für lipophile Stoffe in einem hydrophilen Milieu wie z.B. Blut übernehmen. Für eines der Proteine (24p3) konnte in der BIAcore Analyse keine direkte Bindung an Megalin festgestellt werden. Der Progesteron-Carrier Apolipoprotein D (Apo D) bindet außer zu Megalin auch an andere Rezeptoren der Gen Familie, z.B. VLDL R und LRP. *In vitro* konnte eine Aufnahme und Degradation von Apo D in Megalin exprimierenden Zellen festgestellt werden.

Für das dritte untersuchte Protein ergab sich ein überraschendes Ergebnis. Clara cell secretory protein (CCSP) ist ein Carrierprotein für lipophile Substanzen in der bronchio-alveolaren Flüssigkeit, im Plasma und im Urin. Es transportiert Steroidhormone und polychlorinierte Biphenyle (PCB). Es bindet zwar nicht direkt an Megalin, doch ist seine Aufnahme in Zellen des proximalen Tubulus der Niere abhängig von Megalin. Es gelang erstmalig zu beweisen, dass ein Co-Rezeptorsystem aus Megalin und Cubilin, einem peripheren Membranprotein, *in vivo* existiert. Cubilin und Megalin werden unter anderem in der Niere coexprimiert. Durch BIAcore Analysen wurde eine direkte Bindung von CCSP an Cubilin festgestellt und in Zellkulturversuchen resultiert diese Bindung in

Aufnahme und Degradation von CCSP. Doch die Internalisierung kann nicht nur durch Zugabe von Antikörpern gegen Cubilin, sondern ferner auch durch Antikörper gegen Megalin inhibiert werden. Der Endozytoserezeptor Megalin bindet nicht an CCSP, assoziiert aber mit Cubilin. Konform mit der Rolle der beiden Rezeptoren in der tubulären Resorption verlieren Patienten ohne funktionelles Cubilin oder Megalin defiziente Mäuse CCSP mit dem Urin. Diese Resultaten zeigen, dass ein Co-Rezeptorsystem im proximalen Tubulus der Niere existiert, bestehend aus einem CCSP-bindenden Protein (Cubilin) und einem Endozytoserezeptor (Megalin), das für die gewebsspezifische Aufnahme von CCSP und assoziierten Liganden verantwortlich ist.

Des Weiteren wurde zur Aufklärung der Rolle Megalins in der Aufnahme lipophiler Substanzen der Megalin exprimierende Uterus untersucht. 60 % der weiblichen Megalin Knockout Mäuse zeigen einen Vaginalverschluss. Das Öffnen der Vagina zirka einen Monat nach der Geburt ist ein von 17β -Östradiol abhängiger Vorgang. Es wurde die Megalin Expression im Epithel des Endometriums dokumentiert, die eine Woche nach der Geburt einsetzt und mit Erreichen der Geschlechtsreife geringfügig abnimmt. Bei geschlechtsreifen Mäusen ist die Menge an gebildetem Rezeptor während des Zyklus starken Schwankungen unterworfen. Diese vom Zyklus abhängige Regulation der Megalinexpression deutet auf eine hormonabhängige Rolle des Rezeptors im Uterus hin. Des Weiteren wurde das multifunktionelle Protein Laktoferrin als ein Ligand von Megalin im Uterus nachgewiesen. Die Expression von Laktoferrin im Uterus verhält sich antizyklisch zu der von Megalin.

7. LITERATUR

- AISEN, P., LISTOWSKY, I. (1980) Iron transport and storage proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 357-393
- ÅKERSTROM, B., FLOWER, D.R., SALIER, J.-P. (2000) Lipocalins: unity in diversity. *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 1-8
- ALBERS, H. J., NEVES E CASTRO, M. (1961) The protein components of rat uterine fluid. *Fertility and sterility* **12**, 142-150
- ALBERS, J. J., CHEUNG, M. C., EWENS, S. L., TOLLEFSON, J. H. (1981) Characterization and immunoassay of apolipoprotein D. *Atherosclerosis* **39**, 395-409
- ALLEN, L. S., MCCLURE, J. E., GOLDSTEIN, A. L., BARKLEY, M. S., MICHAEL, S. D. (1984) Estrogen and thymic hormone interactions in the female mouse. *J. Reprod. Immunol.* **6**, 25-37
- AMINOFF, M., CARTER, J. E., CHADWICK, R. B., JOHNSON, C., GRASBECK, R., ABDELAAL, M. A., BROCH, H., JENNER, L. B., VERROUST, P. J., MOESTRUP, S. K., DE LA CHAPELLE, A., KRAHE, R. (1999) Mutations in CUBN, encoding the intrinsic factor – vitamin B12 receptor , Cubilin, cause hereditary megaloblastic anaemia 1. *Nat. Genet.* **21**, 309-313
- ANDERSSON, O., NORDLUND-MOLLER, L., BRONNEGARD, M., SIRZEA, F., RIPE, E., LUND, J. (1991) Purification and level of expression in bronchioalveolar lavage of human polychlorinated biphenyl (PCB)-binding protein: evidence for structural and functional kinship to the multihormonally regulated uteroglobin. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **5**, 6-12
- ARTHUR, A. T., COWAN, B. D., DANIEL, J. C. (1972) Steroid binding to blastokinin. *Fertil. Steril.* **23**, 85-92
- ASPINALL, J. O., BENTEL, J. M., HORSFALL, D. J., HAAGENSEN, D. E., MARSHALL, V. R., TILLEY, W. D. (1995) Differential expression of apolipoprotein D and prostate specific antigen in benign and malignant prostate tissues. *J. Urol.* **154**, 622-628

- ATKINS, A. R., BRERETON, I. M., KROON, P. A., LEE, H. T., SMITH, R. (1998) Calcium is essential for the structural integrity of the cystein-rich, ligand-binding repeat in the low-density lipoprotein receptor. *Biochemistry* **37**, 1332-1670
- AYRAULT – JARRIER, M., LEVY, G., POLONOVSKI, J. (1963) Etude des Alpha-apolipoprotéines sériques humaines par immunoélectrophorèse. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **45**, 703-713
- BALBIN, M., FREIJE, J. M. P., FUEYO, A., SÁNCHEZ, L. M., LÓPEZ – OTÍN, C. (1990) Apolipoprotein D is the major component in cyst fluid from women with human breast gross cystic disease. *Biochem. J.* **271**, 803-80
- BALBIN, M., FUEYO, A., KNÄUPER, V., LOPEZ, J. M., ALVAREZ, J., SÁNCHEZ, L. M., QUESADA, V., BORDALLO, J., MURPHY, G., LÓPEZ – OTÍN, C. (2001) Identification and enzymatic characterization of two diverging murine counterparts of human interstitial collagenase (MMP1) expressed at sites of embryo implantation. *J. Biol. Chem.* **276**, 10253-10262
- BANSAL, A., GIERASCH, L.M. (1991) The NPXY Internalization Signal of the LDL Receptor Adopts a Reverse-Turn Conformation. *Cell* **67**, 1195-1201
- BEIER, H. M. (1968) Uteroglobulin: a hormone-sensitive endometrial protein involved in blastocyst development. *Biochim. Biophys. Acta* **160**, 289 – 291
- BERNARD, A. M., THIELEMANS, N. O., LAUWERYS, R. R. (1994) Urinary protein 1 or Clara cell protein: a new sensitive marker of proximal tubular dysfunction. *Kidney Int. Suppl.* **47**, S34-S37
- BIERI, S., ATKINS, A. R., LEE, H. T., WINZOR, D. J., SMITH, R., KROON, P. A. (1998) Folding, calcium binding and structural characterization of a concatemer of the first and second ligand-binding modules of the low-density lipoprotein receptor. *Biochemistry.* **37**, 10994-11002
- BIERI, S., DJORDJEVIC, J. T., DALY, N. L., SMITH, R., KROON, P. A. (1995 a) Disulfide bridges of a cysteine-rich repeat in the LDL receptor ligand-binding domain. *Biochemistry.* **34**, 13059-13065

- BIERI, S., DJORDJEVIC, J. T., JAMSHIDI, N., SMITH, R., KROON, P. A. (1995 b) Expression and Disulfide-bond connectivity of the second ligand-binding repeat of the human LDL receptor. *Febs Lett.* **371**, 341-344
- BIRKEDAL-HANSEN, H. (1995) Proteolytic remodelling of extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 728-735
- BIRN, H. VERROUST, P. J., NEXØ, E., HAGER, H., JACOBSEN, C., CHRISTENSEN, E. I., MOESTRUP, S. K. (1997) Characterization of a 460 kDa protein that facilitates endocytosis of intrinsic factor – vitamin B12 and binds receptor associated protein. *J. Biol. Chem.* **272**, 26497-26504
- BIRN, H., FYFE, J. C., JACOBSEN, C., MOUNIER, F., VERROUST, P. J., ORSKOV, H., WILLNOW, T. E., MOESTRUP, S. K., CHRISTENSEN, E. I. (2000a) Cubilin is an albumin binding protein important for renal tubular uptake albumin absorption. *J. Clin. Invest.* **105**, 1353-1361
- BIRN, H., VORUM, H., VERROUST, P. J., MOESTRUP, S. K., CHRISTENSEN, E. I. (2000b) Receptor-associated protein is important for normal processing of megalin in kidney proximal tubules. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**, 191-202
- BLACKLOW, S. C., KIM, P. S. (1996) Protein folding and calcium binding defects arising from familial hypercholesterolemia mutations of the LDL R. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 758-762
- BOCHSKANL, R., KIRCHNER, C. (1981) Uteroglobulin and the accumulation of progesterone in the uterine lumen of the rabbit. *Wilh. Roux's Arch.* **190**, 127-131
- BOCHSKANL, R., THIE, M., KIRCHNER, C. (1984) Progesterone dependent uptake of uteroglobin by rabbit endometrium. *Histochemistry* **80**, 581-589
- BOCHSKANL, R., THIE, M., WIRTH, B., KIRCHNER, C. (1988) Uteroglobin as progesterone-binding protein in the preimplantation uterine epithelium of the rabbit: histochemical studies. *Cell Tissue Res.* **252**, 625-630
- BORGHINI, I., BARJY, F., POMETTA, D., JAMES, R. W. (1995) Characterization of subpopulations of lipoprotein particles isolated from human cerebrospinal fluid. *Biochim. Biophys. Acta* **1255**, 192-200

- BORING, C.C., SQUIRES, T.S., TONG, T. (1991) Cancer statistics CA Cancer J. Clin. **41**, 19-36
- BOYLES, J. K., NOTTERBEK, L. M., ANDERSON, L. J. (1990) Accumulation of apolipoprotein D in the regenerating and remyelinating mammalian peripheral nerve. Identification of apolipoprotein D, apolipoprotein A-IV, apolipoprotein E and apolipoprotein A-I. J. Biol. Chem. **265**, 17805-17815
- BRANDES, C., NOVAK, S., STOCKINGER, W., HERZ, J., SCHNEIDER, W. J., NIMPF, J. (1997) Avian and murine LR8B and human apolipoprotein E receptor 2: differentially spliced products from corresponding genes. Genomics **42**, 185-191
- BRANDES, C., KAHR, L., STOCKINGER, W., HIESBERGER, T., SCHNEIDER, W. J., NIMPF, J. (2001) Alternativ splicing in the ligand binding domain of mouse apoE receptor-2 produces receptor variants binding reelin but not α 2-macroglobulin. J. Biol. Chem. **276**, 22160-22169
- BRANDT, I., LUND, J., BERGMAN, A., KLASSON-WEHLER, E., POELLINGER, L., GUSTAFSSON, J. A. (1985) Target cells for the polychlorinated biphenyl metabolite 4,4'-bis(methylsulfonyl)-2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl in lung and kidney. Drug. Metab. Dispos. **13**, 490-496
- BROWN, M. S., GOLDSTEIN, J. L. (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science **232**, 34-47
- BROWN, S. D., TWELLS, R. C. J., HEY, P. J., COX, R. D., LEVY, E. R., SODERMAN, A. R., METZKER, M. L., CASKEY, C. T., TODD, J. A., HESS, J. F. (1998) Isolation and characterization of LRP6, a novel member of the low density lipoprotein receptor gene family. Biochem. Biophys. Res. Commun. **248**, 879-888
- BROWN, T. L., MOULTON, B. C., BAKER, V. V., MIRA, J., HARMONY, J. A. (1995) Expression of apolipoprotein J in the uterus is associated with tissue remodelling. Biol. Reprod. **52**, 1038-1049
- BU, G., MAKSYMIVITCH, E. A., GEUZE, H., SCHWARTZ, A. L. (1994) Subcellular localization and endocytic function of low density lipoprotein receptor in human glioblastoma cells. J. Biol. Chem. **269**, 29874-29882
- BUC-CARON, M. H., CONDAMINE, H., KERJASCHKI, D. (1987) Rat Heymann nephritis antigen is closely related to brushin, a glycoprotein

- present in early mouse embryo epithelia. *Ann. Inst. Pasteur. Immunol.* **138**, 707-722
- BUJO, H., YAMAMOTO, T., HAYASHI, K., HERMAN, M., NIMPF, J., SCHNEIDER, W. J. (1995) Mutant oocyte low density lipoprotein receptor gene family member causes atherosclerosis and female sterility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 9905-9909
- BULLEN, J. J., ROGERS, H. J., GRIFFITHS, E. (1978) Role of iron in bacterial infections. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **80**, 1-35
- CAMATO, R., MARCEL, Y. L., MILNE, R. W., LUSSIER-CACAN, S., WEECH, P. K. (1989) Protein polymorphism of human plasma apolipoprotein D antigenic epitome. *J. Lipid Res.* **30**, 865-875
- CAMPBELL, I. D., BORK, P. (1993) Epidermal growth factor –like modules. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**, 385-392
- CHEN, W.-J., GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S. (1990) NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* **265**, 3116-3123
- CHIANG, C., LITINGTUNG, Y., LEE, E., YOOUNG, K. E., CORDEN, J. L., WESTPHAL, H., BEACHY, P. A. (1996) Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* **383**, 407-413
- CHRISTENSEN, E. I., BIRN, H., VERROUST, P., MOESTRUP, S. K. (1998) Membrane receptors for endocytosis in the renal proximal tubule. *Inter. Rev. Cytol.* **180**, 237-284
- CHRISTENSEN, E. I., MOSKAUG, J. O., VORUM, H., JACOBSEN, C., GUNDERSEN, T. E., NYKJAER, A., BLOMHOFF, R., WILLNOW, T. E., MOESTRUP, S. K. (1999a) Evidence for an essential role of Megalin in transepithelial transport of retinol. *J. Am. Soc. Nephrol.* **10**, 685-695
- CHRISTENSEN, E. I., WILLNOW, T. E. (1999b) Essential role of Megalin in renal proximal tubule for vitamin homeostasis. *Am. Soc. Nephrol.* **10**, 2224-2236
- CHRISTENSEN, E. I., BIRN, H. (2002) Megalin and Cubilin: multifunctional endocytic receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 256-66

- CHRISTIE, R. H., CHUNG, H., REBECK, G. W., STRICKLAND, D., HYMAN, B. T. (1996) Expression of a very low-density lipoprotein receptor (VLDL-r), an apolipoprotein-E receptor, in the central nervous system and in Alzheimer's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **55**, 491-498
- CHU, S.T., HUANG, H. L., CHEN, J. M., CHEN, Y. H. (1996) Demonstration of a glycoprotein derived from the 24p3 gene in mouse uterine luminal fluid. *Biochem. J.* **316**, 545-550
- CHU, S.T., LIN, H. J., CHEN, Y. H. (1997) Complex formation between a formyl peptide and 24p3 protein with a blocked N-terminus of pyroglutamate. *J. Pept. Res.* **49**, 582-585
- CHU, S.T., LEE, Y. C., NEIN, K. M., CHEN, Y. H. (2000) Expression, immunolocalization and sperm-association of a protein derived from 24p3 gene in mouse epididymis. *Mol Reprod Dev.* **57**, 26-36.
- COFER, S., ROSS, S. R. (1996) The murine gene encoding apolipoprotein D exhibits a unique expression pattern as compared to other species. *Gene* **171**, 261-263
- COWAN, S. W., NEWCOMER, M. E., JONES, T. A. (1990) Crystallographic refinement of human serum retinol binding – protein at 2 angstroms resolution. *Proteins Struc Funct. Genet.* **8**, 44-61
- CROUCH, S. P. M., SLATER, K. J., FLETCHER, J. (1992) Regulation of cytokine release from mononuclear cells by the iron-binding protein lactoferrin. *Blood* **80**, 235-240
- DALY, N. L., DJORDJEVIC, J. T., KROON, P. A., SMITH, R. (1995 a) Three-dimensional structure of the second cysteine – rich repeat from the human low-density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 6334-6338
- DALY, N. L., SCANLON, M. J., DJORDJEVIC, J. T., KROON, P. A., SMITH, R. (1995 b) Three-dimensional structure of a cysteine – rich repeat from the human low-density lipoprotein receptor. *Biochemistry* **34**, 14474-14481
- DAVIDSON, N. E., LIPPMAN, M.E. (1989) The role of estrogens in growth regulation of breast cancer *Oncogenesis J.* **1**, 89-104

- DAVIS, C.G., ELHAMMER, A., RUSSELL, D.W., SCHNEIDER, W. J., KORNFELD, S., BROWN, M.S. , GOLDSTEIN, J.L. (1986) Deletion of clustered O-linked carbohydrates does not impair function of low density lipoprotein receptor in transfected fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **261**, 2828-2838
- DAVIS, C.G., GOLDSTEIN, J.L., SÜDHOF, T.C., ANDERSON, R.G.W., RUSSELL, D.W., BROWN, M.S. (1987) Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature* **326**, 760-765.
- DEVIREDDY, L. R., TEODORO, J. G., RICHARD, F. A., GREEN, M. R. (2001) Induction of apoptosis by secreted Lipocalin that is transcriptionally regulated by IL-3 deprivation. *Science* **293**, 829-834
- DIEZ-ITZA, I., VIZOSO, F., MERINO, A. M., SANCHEZ, L. M., TOLIVA, J., FERNANDEZ, J., RUBIAL, A., LOPEZ-OTIN, C. (1994) Expression and prognostic significance of apolipoprotein D in breast cancer. *Am. J. Pathol.* **144**, 310-320
- DILLEY, W. G., HAAGENSEN, D. E., COX, C. E., WELLS JR., S. A. (1990) Immunologic and steroid binding properties of the GCDFP-24 protein isolated from human cystic disease fluid. *Breast Cancer Res. Treat.* **16**, 253-260
- DOLMER, K., HUANG, W., GETTINGS, P. G. W. (1998) Characterization of the calcium side in two complement - like domains from the low - density lipoprotein receptor - related protein (LRP) and comparison with a repeat from the low - density lipoprotein receptor. *Biochemistry* **37**, 17016-17023
- DONG, Y., LATHROP, W., WEAVER, D., QIU, Q., CINI, J., BERTOLINI, D., CHEN, D. (1998) Molecular cloning and characterization of LR3, a novel LDL receptor family protein with mitogenic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **251**, 784-790
- DRAYNA, D. T., FIELDING, C., MCLEAN, BAER, B., CASTRO, G., CHEN, E., COMSTOCK, L., HENZEL, W., KOHR, W., WION, K. L., LAWN, R. M. (1986) Cloning and expression of human apolipoprotein D cDNA. *J. Biol. Chem.* **261**, 16535-16539

- DRAYNA, D. T., MCLEAN, J. W., WION, K. L., TRENT, J. M., DRAPKIN, H. A., LAWN, R. M. (1987) Human apolipoprotein D gene: gene sequence, chromosome localization and homology to the alpha-2 μ -globulin superfamily. *DNA* **6**, 199-204
- DUNKEL, R., VRIEND, G., BEATO, M., SUSKE, G. (1995) Progesterone binding to uteroglobin: two alternative orientations of the ligand. *Proetin. Eng.* **8**, 71-79
- EKSTRÖM, B., PETERSON, P. A., BERGGÅRD, I. (1975) A urinary and plasma alpha 1-glycoprotein of low molecular weight: isolation and some properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **65**, 1427-1433
- FASS, D., BLACKLOW, S., KIM, P. S., BERGER, J. M. (1997) Molecular basis of familial hypercholesterolaemia from structure of LDL receptor module. *Nature* **388**, 691-693
- FLOWER, D. R., NORTH, A. C. T., ATTWOOD, T. K. (1993) Structure and sequence relationships in the lipocalins and related proteins. *Protein Sci.* **2**, 753-761
- FLOWER, D. R. (1995) Multiple molecular recognition properties of the lipocalin protein family. *J. Mol. Recogn.* **8**, 185-195
- FLOWER, D. R. (1996) The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J.* **318**, 1-14
- FLOWER, D. R., NORTH, A. C. T., SANSOM, C. E. (2000) The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochem. Biophys. Acta.* **1482**, 9-24
- FRAKER, P. J., SPECK, J. C. (1978) Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloramide 1,3,4,6,-tetrachloro-3a,6a-diphrenylglycoluril. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **80**, 849-857
- FRYKMAN, P. K., BROWN, M. S., YAMAMOTO, T., GOLDSTEIN, J. L., HERZ, J. (1995) Normal plasma lipoproteins and fertility in gene-targeted mice homozygous for a disruption in the gene encoding very low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 8453-8457
- GARAY-ROJAS, E., HARPER, M., HRABA-RENEVEY, S., KRESS, M. (1996) An apparen't autocrine mechanism amplifies the dexamethasone-and

- retinoic acid-induced expression of the mouse lipocalin – encoding gene 24p3. *Gene* **170**, 173-180
- GARRE, C., BIANCHI-SCARRA, G., SIRITO, M., MUSSO, M., RAVAZZOLO, R. (1992) Lactoferrin binding sites and nuclear localization in K562(S) cells. *J. Cell Physiol.* **153**, 477-482
- GLIEMANN, J. (1998) Receptors of the low density lipoprotein (LDL) receptor family in man. Multiple functions of the large family via interaction with complex ligands. *J. Biol. Chem.* **379**, 951-964
- GOESSLING, W., ZUCKER, S. D. (2000) Role of apolipoprotein D in the transport of bilirubin in the plasma. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **279**, G356-G365
- GOLDSTEIN, J. L., BASU, S. K., BRAUN, M. S., (1983) Receptor mediated endocytosis of low-density lipoprotein in cultured cells. *Meth. Enzymol.* **98**, 241-260
- GOLDSTEIN, J. L., BRAUN, M. S., ANDERSON, R. G. W., RUSSELL, D. W., SCHNEIDER, W. J. (1985) Receptor mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu. Rev. Cell Biol.* **1**, 1-39
- GROVES, M. L. (1960) The isolation of a red protein from milk. *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 3345-3350
- GUETH-HALLONET, C., SANTA-MARIA, A., VERRON, P., MARO, B. (1994) Gp 330 is specifically expressed in outer cells during epithelial differentiation in the preimplantation mouse embryo. *Development* **120**, 3289-3299
- HAAGENSEN, C. D., BODIAN, C., HAAGENSEN, D. E. (1981) Breast carcinoma: risk and detection. Philadelphia: W. B. Saunders and Co
- HAAGENSEN, D. E., MAZOUJIAN, G. (1986) Biochemistry and immunohistochemistry of fluid proteins of the breast in gross cystic disease, in: C. D. Haagensen (Ed.), *Diseases of the breast*, 3rd edn., Philadelphia: W. B. Saunders, 474, 500
- HAMMAD, S. M., STEFANSSON, S. M., TWAL, W., DRAKE, C. J., FLEMING, P., REMALEY, A., BREWER, JR., H. B., ARGRAVES, W. S. (1999) Cubilin, the endocytic receptor for intrinsic factor-vitamin B12

- complex, mediates high-density lipoprotein holoparticle endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 10158-10163
- HAMMAD, S. M., BARTH, J. L., KNAAK, C., ARGRAVES, W. S. (2000) Megalin acts in concert with Cubilin to mediate endocytosis of high density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* **275**, 12003-12008
- HANDFORD, P. A., MAYHEW, M., BARON, M., WINSHIP, P. R., CAMPBELL, I. D., BROWNLEE, G. G. (1991) Key residues involved in calcium-binding motifs in EGF-like domains. *Nature* **351**, 164-167
- HARD, T., BARNES, H. J., LARSSON, C., GUSTAFSSON, J. A., LUND, J. (1995) Solution structure of mammalian PCB-binding protein in complex with PCB. *Nat. Struct. Biol.* **2**, 983-989
- HARLOW, E., LANE, D. (1988) *Antibodies: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbour Press.
- HARRIS, D. A. (1999) Cellular biology of prion diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 429-444
- HENNART, P. F., BRASSEUR, D. J., DELOGNE-DESNOECK, J. B., DRAMAIX, M. M., ROBYN, C. E. (1991) Lysozyme, lactoferrin and secretory immunoglobulin A content in breast milk : influence of duration of lactation, nutrition status, prolactin status and parity of mother. *Am. J. Clin. Nutr.* **53**, 32-39
- HERMO, L., LUSTIG, M., LEFRANCOIS, S., ARGRAVES, W.S., AND MORALES, C.R. (1999) Expression and regulation of LRP-2/megalin in epithelial cells lining the efferent ducts and epididymis during postnatal development. *Mol. Reprod. Dev.* **53**, 282-293
- HERZ, J., HAMANN, U., ROGNE, S., MYCLEBOST, O., GAUSEPOHL, H., STANLEY, K. K. (1988) Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *EMBO J.* **7**, 4119-4127
- HERZ, J., GOLDSTEIN, J.L., STRICKLAND, D.K., HO, Y.K., BROWN, M.S. (1991) 39-kDa protein modulates binding of ligands to a Low Density Lipoprotein receptor-related Protein/ α 2-Macroglobulin Receptor. *J. Biol. Chem.* **266**, 21232-21238

- HERZ, J., WILLNOW, T. E., FARESE, JR., R. V. (1997) Cholesterol, hedgehog and embryogenesis. *Nat. Genet.* **15**, 123-124
- HEY, P. J., TWELLS, R. C. J., PHILIPS, M. S., YUSUKE, N., BROWN, S. D., KAWAGUCHI, Y., COX, R., GUOCHUN, X., DUGAN, V., HAMMOND, H., METZKER, M. L., TODD, J. A., HESS, J. F. (1998) Cloning of a novel member of the low-density lipoprotein receptor family. *Gene*, **216**, 103-111
- HIESBERGER, T., TROMMSDORF, M., HOWELL, B. W., GOFFINET, A., MUMBY, M. C., COOPER, J. A., HERZ, J. (1999) Direct binding of Reelin to VLDL receptor and Apo E receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of Disabled-1 and modulates Tau phosphorylation. *Neuron* **24**, 481-489
- HILPERT, J., VORUM, H., BURMEISTER, R., SPOELGEN, R., GRISHKOVSKAYA, I., MISSELWITZ, R., NYKJAER, A., WILLNOW, T. E. (2001) Efficient eukaryotic expression system for authentic human sex hormone – binding globulin. *Biochem. J.* **360**, 609-615
- HILPERT, J., WOGENSEN, L., THYKJAER, T., WELLNER, M., SCHLICHTING, U., ORNTOFT, T. F., BACHMANN, S., NYKJAER, A., WINNOW, T. E. (2002) Expression profiling confirms role of endocytic receptor Megalin in renal vitamin D3 metabolism. *Kidn. Int.* **in press**
- HJÄLM, G., MURRAY, E., CRUMLEY, G., HARAZIM, W., LUNDGREN, S., ONYANGO, I., EK, B., LARSSON, M., JUHLIN, C., HELLMAN, P., DAVIS, H., ÅKERSTRÖM, G., RASK, L., MORSE, B. (1996) Cloning and sequencing of the human go330, a Ca²⁺-binding receptor with a potential intracellular signalling properties. *Eur. J. Biochem.* **239**, 132-137
- HOBBS, H. H., BROWN, M. S., GOLDSTEIN, J. L. (1992) Molecular genetics of the LDL R gene in familial hypercholesterolemia. *Hum. Mutat.* **1**, 445-466
- HOBBS, H. H., RUSSELL, D. W., BROWN, M. S., GOLDSTEIN, J. L. (1990) The LDL R locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Annu. Rev. Genet.* **24**, 133-170
- HOWELL, B. W., HERZ, J. (2001) The LDL receptor gene family: signalling functions during development. *Curr. Opin. Neurobiol.* **11**, 74-81

- HU, Z. Y., BOURREAU, E., JUNG-TESTAS, I., ROBEL, P., BAULIEU, E.-E. (1987) Neurosteroids : oligodendrocyte mitochondria convert cholesterol to pregnenolone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 8215-8219
- HUANG, H. L., CHU, S. T., CHEN, Y. H. (1999) Ovarian steroids regulate 24p3 expression in mouse uterus during the natural estrous cycle and preimplantation period. *J. Endocrinology* **162**, 11-19
- HUBER, R., SCHNEIDER, M., MAYR, I., MULLER, R., DEUTZMANN, R., SUTER, F., ZUBER, FALK, H., KAYSER, H. (1987) Molecular structure of the bilin binding-protein (BBP) from *Pieris brassicae* after refinement at 2.0-Å resolution. *J. Mol. Biol.* **198**, 499-513
- ISHIBASHI, S., BROWN, M. S., GOLDSTEIN, J. L., GERARD, R. D., HAMMER, R. E., HERZ, J. (1993) Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus – mediated gene delivery. *J. Clin. Invest.* **92**, 883-893
- IYER, S., LÖNNERDAL, B. (1993) Lactoferrin, lactoferrin receptors and iron metabolism. *Eur. J. Clin. Nutr.* **47**, 232-241
- JEFFERSON, W.N., PADILLA-BANKS, E., NEWBOLD, R.R. (2000) Lactoferrin is an estrogen responsive protein in the uterus of mice and rats. *Reprod. Toxicol.* **14**, 103-110
- JENSEN, S. (1966) Report of a new chemical hazard. *New Sci.* **32**, 612
- JENTOFT, N. (1990) Why are proteins O-glycosylated? *Trends Biochem. Sci.* **15**, 291-294
- JOKINEN, E. V., LANDSCHULZ, K. T., WYNE, K. L., HO, Y. K., FRYKMAN, P. K., HOBBS, H. H. (1994) regulation of the very low density lipoprotein receptor by thyroid hormone in rat skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **269**, 26411-26418
- JONES, S. E., JOMARY, C. (2002) Clusterin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 427-431
- KAJINAMI, K., MABUCHI, H., ITOH, H., MICHISHTA, I., TAKEDA, M., WAKASUGI, T., KOIZUMI, J., TAKEDA, R. (1988) New variant of low density lipoprotein receptor gene. *FH-Tonami. Arteriosclerosis* **8**, 187-192

- KANAI, M., RAZ, A., GOODMAN, D. (1968) Retinol binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma. *J. Clin. Invest.* **47**, 2025-2044
- KERJASCHKI, D., FARQUHAR, M. D. (1982) The pathogenic antigen of Heymann nephritis is a membran glycoprotein of the renal proximal tubule brush border. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 5557-5581.
- KIM, D.-H., IJIMA, H., GOTO, K., SAKAI, J., ISHII, H., KIM, H.-J., SUZUKI, H., KONDO, H., SAEKI, S., YAMAMOTO, T. T. (1996) Human apolipoprotein E receptor 2. A novel lipoprotein receptor of the low density lipoprotein receptor family predominantly expressed in brain. *J. Biol. Chem.* **271**, 8373-8380
- KIM, D.-H., MAGOORI, K., INOUE, T. R., MAO, C. C., KIM, H.-J., FUJITA, T., ENDO, Y., SAEKI, S., YAMAMOTO, T. T. (1997) Exon / intron organization, chromosome localization, alternative splicing and transcription units of the human apolipoprotein E receptor 2 gene. *J. Biol. Chem.* **272**, 8498-8504
- KJELDSSEN, L., JOHNSEN, A. H., SENGELØV, H., BORREGAARD, N. (1993) Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J. Biol. Chem.* **268**, 10425-10432
- KOHFELDT, E., MAURER, P., VANNAHME, C., TIMOLE, R. (1997) Properties of the extracellular calcium binding module of the proteoglycan testican. *FEBS Lett.* **414**, 557-561
- KOIVISTO, P. V., KOIVISTO, U. M., KOVANEN, P. T., GYLLING, H., MIETTINGEN, T. A., KONTULA, K. (1993) Deletion of exon 15 of the LDL receptor gene is associated with a mild form of familial hypercholesterolemia. *FH-Espoo. Arterioscler. Thromb.* **13**, 1680-1688
- KOLLEK, I., WISSEL, H., GUTHMANN, F., SCHLAME, M., SINHA, P., RUSTOW, B. (2002) HDL-holoparticle uptake by alveolar type II cells: effect of vitamin E status. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **27**, 57-63
- KORSCHINECK, I., ZIEGLER, S., BREUSS, J., LANG, I., LORENZ, M., KAUN, C., AMBROS, P. F., BINDER, B. R. (2001) Identification of a novel exon in apolipoprotein E receptor 2 leading alternatively spliced

- mRNAs found in cells of the vascular wall but not in neuronal tissue. *J. Biol. Chem.* **276**, 13192-13198
- KOUNNAS, M.Z., HAUDENSCHILD, C.C., STRICKLAND, D.K., AND ARGRAVES, W.S. (1994) Immunological localization of glycoprotein 330, low density lipoprotein receptor related protein and 39 kDa receptor associated protein in embryonic mouse tissues. *In Vivo*. **8**, 343-351
- KOUNNAS, M.Z., LOUKINOVA, E. B., STEFANSSON, S., HARMONY, J. A., BREWER, B. H., STRICKLAND, D.K., AND ARGRAVES, W.S. (1995) Identification of glycoprotein 330 as an endocytic receptor for apolipoprotein J / clusterin. *J. Biol. Chem.* **270**, 23234
- KOZYRAKI, R., KRISTIANSEN, M., SILAHTAROGLU, A., HANSEN, C., JACOBSEN, C., TOMMERUP, N., VERROUST, P. J., MOESTRUP, S. K. (1998) The human intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin: molecular characterization and chromosomal mapping of the gene to 10p within the autosomal recessive megaloblastic anemia (MGA1) region. *Blood* **91**, 3593-3600
- KOZYRAKI, R., FYFE, J., KRISTIANSEN, M., GERDES, C., JACOBSEN, C., CUI, S., CHRISTENSEN, E. I., AMINOFF, M., DE LA CHAPELLE, A., KRAHE, R., VERROUST, P. J., MOESTRUP, S. K. (1999) The intrinsic factor – vitamin B12 receptor, cubilin, is a high affinity apolipoprotein A-I receptor facilitating endocytosis of high-density lipoprotein. *Nat Med.* **5**, 656-61.
- KOZYRAKI, R., FYFE, J., VERROUST, P. J., JACOBSEN, C., DAUTRY-VARSAT, A., GBUREK, J., WILLNOW, T. E., CHRISTENSEN, E. I., MOESTRUP, S. K. (2001) Megalin-dependent Cubilin- mediated endocytosis is a major pathway for the apical uptake of transferrin in polarized epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 12491-12496
- KRISHNAN, R. S., DANIEL, J. C. (1967) „Blastokinin: Inducer and regulator of blastocyst development in rabbit uterus. *Science* **158**, 490 - 492
- KRISTIANSEN, M., KOZYRAKI, R., JACOBSEN, C., NEXO, E., VERROUST, P. J., MOESTRUP, S. K. (1999) Molecular dissection of the intrinsic factor - Vitamin B12 receptor Cubilin discloses regions important for

- membrane association and ligand binding. *J. Biol. Chem.* **274**, 20540-20544
- KRISTIANSEN, M., AMINOFF, M., JACOBSEN, C., KRAHE, R., DE LA CHAPELLE, A., VERROUST, P. J., MOESTRUP, S. K. (2000) The cubilin P1297L mutation associated with hereditary megaloblastic anaemia 1 (MGA1) causes impaired recognition of intrinsic factor-vitamin B12 by cubilin. *Blood* **96**, 405-409
- LABRIE, F., DUPONT, A., BÉLANGER, A., ST. ARNAUD, R., GIGUÈRE, M., LACOURCIÈRE, Y., EMOND, J., MONFETTE, G. (1986) Treatment of prostate cancer with gonadotropin-releasing hormone antagonists. *Endocrine Rev.* **7**, 67-74
- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LEA, O. A. (1988) Binding properties of progesterone-binding cyst protein (PBCP). *Steroids* **52**, 337-338
- LEE, L. G., CONNELL, C. R., BLOCH, W. (1993) Allelic discrimination by nick – translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* **21**, 3761-3766
- LEHESTE, J.-R., ROLINSKI, B., VORUM, H., HILPERT, J., NYKJAER, A., JACOBSEN, C., AUCOULTURIER, P., MOSKAUG, Ø. J., OTTO, A., CHRISTENSEN, E.I., WILLNOW, T.E. (1999) Megalin knockout mice as an animal model of low molecular weight proteinuria. *Am. J. Pathol.* **155**, 1361-1370
- LE PANSE, S., AYANI, E., NIELSEN, S., RONCO, P., VERROUST, P., CHRISTENSEN, E. I. (1997a) Internalization and recycling of glycoprotein 280 in epithelial cells of the yolk sac. *Eur. J. Cell Biol.* **72**, 257-267
- LE PANSE, S., VERROUST, P., CHRISTENSEN, E. I. (1997b) Internalization and recycling of glycoprotein 280 in BN/MCV yolk sac epithelial cells: a model system of relevance to receptor – mediated endocytosis in the renal proximal tubule. *Exp. Nephrol.* **5**, 375-383
- LE SOUEF, P. N. (2001) Growth and development of the lung. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **1**, 127-131

- LEVINE, J. S., ALLEN, R. H., ALPERS, D. H., SEETHARAM, B. (1984) Immunocytochemical localization of the intrinsic factor – cobalamin receptor in dog ileum: distribution of intracellular receptor during cell maturation. *J. Cell Biol.* **272**, 26497-26504
- LIU, Q., NIELSEN - HAMILTON, M. (1995) Identification of a new acute phase protein. *J. Biol. Chem.* **270**, 22565-22570
- LIU, Q., RYON, J., NILSEN-HAMILTON, M. (1997) Uterocalin: a mouse acute phase protein expressed in the uterus around birth. *Mol. Reprod. Dev.* **46**, 507-514
- LIU, C.-X., MUSCO, S., LISITSINA, N. M., FORGACS, E., MINNA, J.D., LISITSYN, N. A. (2000a) LRP-DIT, a putative endocytic receptor gene, is frequently inactivated in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res.* **60**, 1961-1967
- LIU, C.-X., MUSCO, S., LISITSINA, N. M., YAKLICHKIN, S. Y., LISITSYN, N. A. (2000b) Genomic organization of a new candidate tumor suppressor gene, LRP1B. *Genomics* **69**, 271-274
- LIU, C.-X., LI, Y., OBERMOELLER-MCCORMICK, L. M., SCHWARTZ, A. L., BU, G. (2001) The putative suppressor LRP1B, a novel member of the LDL receptor family, exhibits both overlapping and distinct properties with the LDL receptor-related protein LRP). *J. Biol. Chem.* **276**, 28889-28896
- LUND, J., BRANDT, I., POELLINGER, L., BERGMANN, A., KLASSON-WEHLER, E., GUSTAFASSON, J. A. (1985) Target cells for the polychlorinated biphenyl metabolite 4,4'-bis(methylsulfonyl)-2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl. Characterization of high affinity binding in rat and mouse lung cytosol. *Mol. Pharmacol.* **27**, 314-323
- LUND, J., DEVEREUX, T., GLAUMANN, H., GUSTAFASSON, J. A. (1988a) Cellular and subcellular localization of a binding protein for polychlorinated biphenyl in rat lung. *Drug. Metab. Dispos.* **16**, 590-599
- LUND, J., NORDLUND, L., GUSTAFSSON, J. A. (1988b) Partial purification of a binding protein for polychlorinated biphenyls from rat lung cytosol: physicochemical and immunochemical characterization. *Biochemistry* **27**, 7895-7901

- LUNDGREN, S., CARLING, T., HJÄLM, G., JUHLIN, C., RASTAD, J., PHILGREN, U., RASK, L., ÅKERSTRÖM, G., HELLMAN, P. (1997) Tissue distribution of human gp330/Megalin, a putative Ca²⁺-sensing protein. *J. Histochem. Cytochem.* **45**, 383-392
- MASSARO, G. D., SINGH, G., MASON, R., PLOPPER, C. G., MALKINSON, A. M., GAIL, B. G. (1994) Biology of the Clara cell: conference report. *Am. J. Physiol.* **266**, L101-L106
- MASSON, P. L., HEREMANS, J. F., DIVE, C. (1966a) An iron-binding protein common in many external secretions. *Clin. Chim. Acta* **14**, 735-739
- MASSON, P. L., HEREMANS, J. F., PRIGUOT, J. J., WAUTERS, G. (1966b) Immunohistochemical localization and bacteriostatic properties of an iron-binding protein from bronchial mucus. *Thorax* **21**, 538-544
- MARAZZITI, D., EGGERTSEN, G., FEY, G. H., STANLEY, K. K. (1988) Relationships between the gene and protein structure in human complement component C9. *Biochemistry.* **27**, 6529-6534
- MARTENSEN, P. M., OKA, K., CHRISTENSEN, L., RETTENBERGER, P. M., PETERSEN, H. H., CHRISTENSEN, A., CHAN, L., HEEGAARD, C. W., ANDREASEN, P. A. (1997) Breast carcinoma epithelial cells express a very low-density lipoprotein receptor variant lacking the O-linked glycosylation domain encoded by exon 16, but with full binding activity for serine proteinase/serpin complexes and Mr-40000 receptor-associated protein. *Eur. J. Biochem.* **95**, 511-519
- MCCONATHY, W.J., ALAUPOVIC, P. (1973) Isolation and partial characterization 178-182 of apolipoprotein D, a new protein moiety of the human plasma lipoprotein system. *FEBS Lett.* **37**,
- MENDEL, C. M. (1989) The free hormone hypothesis: A physiological based mathematical model. *Endocrine Reviews* **10**, 232-274
- MIELE, L., CORDELLA – MIELE, E., MUKHERJEE, A. B. (1987) Uteroglobin: structure, molecular biology and new perspectives on its function as a Phospholipase A2 inhibitor. *Endocr. Rev.* **8**, 474-490
- MOESTRUP, S. K., GLIEMANN, J., PALLESEN, G. (1992) Distribution of the α 2-microglobulin receptor/low density lipoprotein receptor – related protein in human tissues. *Cell Tissue Res.* **269**, 375-382

- MOESTRUP, S. K., NIELSEN, S., ANDREASEN, P., JORGENSEN, K. E., NYKJAER, A., ROIGAARD, H., GLIEMANN, J., CHRISTENSEN, E. I. (1993) Epithelial glycoprotein-330 mediates endocytosis of plasminogen activator-plasminogen activator inhibitor type-1 complexes. *J. Biol. Chem.* **268**, 16564-16570
- MOESTRUP, S. K. (1994) The α 2-macroglobulin receptor and epithelial glycoprotein-330. Two giant receptors mediating endocytosis of multiple ligands. *Biochem. Biophys. Acta.* **1197**, 197-213
- MOESTRUP, S. K., BIRN, H., FISCHER, P. B., PETERSEN, C. M., VERROUST, P. J., SIM, R. B., CHRISTENSEN, E. I., NEXØ, E. (1996) Megalin-mediated endocytosis of transcobalamin-vitamin-B12 complexes suggests a role of the receptor in vitamin-B12 homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 8612-8617
- MOESTRUP, S. K., KOZYRAKI, R., KRISTIANSEN, M. KAYSEN, J. H., RASMUSSEN, H. H., BRAULT, D., PONTILLON, F., GODA, F. O., CHRISTENSEN, E. I., HAMMOND, T. G., VERROUST, P. (1998) The intrinsic factor vitamin-B12 receptor and target of teratogenic antibodies is a Megalin - binding peripheral membrane protein with homology to developmental proteins. *J. Biol. Chem.* **273**, 5235-5242
- MORAIS-CABRAL, J. H. M., ATKINS, G. L., SANCHEZ, L. M., LOPEZ-BOADO, Y. S., LOPEZ-OTIN, C., SAWYER, L. (1995) Arachidonic acid binds to apolipoprotein D: implications for the protein's function. *FEBS Lett.* **366**, 53-56
- MULLER-SCHOTTLE, F., CLASSEN-LINKE, I., ALFER, J., KRUSCHE, C., BEIER-HELLWIG, K., STERZIK, K., BEIER, H. M. (1999) Expression of uteroglobulin in the human endometrium. *Mol. Hum. Reprod.* **5**, 1155-1161
- NAKAMURA, Y., YAMAMOTO, M., KUMAMARU, E. (1998) A variant very low density lipoprotein receptor lacking 84 base pairs of O-linked sugar domain in human brain myelin. *Brain Res.* **793**, 47-53
- NAKAYAMA, M., NAKAJIMA, D., NAGASE, T., NOMURA, N., SEKI, N., OHARA, O. (1998) Identification of high-molecular weight proteins with multiple EGF-Like motifs by motif-trap screening. *Genomics* **51**, 27-34

- NAVARRO, A., TOLIVIA, J., ASTUDILLO, A., DEL VALLE, E. (1998) Pattern of apolipoprotein D immunoreactivity in human brain. *Neurosci. Lett.* **254**, 17-20
- NEELS, J. G., HORN, I. R., VAN DEN BERG, B. M. M., PANNEKOEK, H., VAN ZONNEFELD, A.-J. (1998) Ligand-receptor interactions of the low density lipoprotein receptor-related protein, a multi-ligand endocytic receptor. *Fibrinolysis & Proteolysis* **12**, 219-240
- NICHOLS, B. L., MCKEE, K. S., HENRY, J. F., PUTMAN, M. (1987) Human lactoferrin stimulates thymidine incorporation into DNA of rat crypt cells. *Pediatr. Res.* **21**, 563-567
- NORTH, C. L., BLACKLOW, S. C. (1999) Structural independence of ligand-binding modules five and six of the LDL receptor. *Biochemistry* **38**, 3926-3935
- NORTH, C. L., BLACKLOW, S. C. (2000) Solution structure of the sixth LDL-A module of the LDL receptor. *Biochemistry* **39**, 2564-2571
- NOVAK, S., HIESBERGER, T., SCHNEIDER, W. J., NIMPF, J. (1996) A new low density lipoprotein receptor homologue with 8 ligand binding repeats in brain of chicken and mouse. *J. Biol. Chem.* **271**, 11732-11736
- NYKJAER, A., KJØLLER, L., CHEN, R. L., LAWRENCE, D. A., GARNI-WAGNER, B. A., TODD, R. F., 3RD, VAN ZONNEFELD, A.-J., GLIEMANN, J., ANDREASEN, P. A. (1994) Regions involved in binding of urokinase-type-1 inhibitor complex and pro-urokinase to the endocytic α 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein. Evidence that the urokinase receptor protects pro-urokinase against binding to the endocytic receptor. *J. Biol. Chem.* **269**, 25668-25676
- NYKJAER, A., CONESE, M., CHRISTENSEN, E. I., OLSON, D., CREMONA, O., GLIEMANN, J., BLASI, F. (1997) Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA : serpin complexes. *EMBO J.* **16**, 2610-2620
- NYKJAER, A., DRAGUN, D., WALTHER, D., VORUM, H., JACOBSEN, C., HERZ, J., MELSEN, F., CHRISTENSEN, E. I., WILLNOW, T. E. (1999) An endocytic pathway essential for the renal uptake and activation of the steroid 25-(OH)vitamin D₃. *Cell* **96**, 507-515

- NYKJEAR, A., FYFE, J. C., KOZYRAKI, R., LEHESTE, J. R., JACOBSEN, C., NIELSEN, M. S., VERROUST, P. J., AMINOFF, M., DE LA CHAPELLE, A., MOESTRUP, S. K., RAY, R., GLIEMANN, J., WILLNOW, T. E., CHRISTENSEN, E. I. (2001) Cubilin dysfunction causes abnormal metabolism of the steroid hormone 25(OH)Vitamin D₃. PNAS **24**, 13895-13900
- NYKJEAR, A., WILLNOW, T. E. (2002) The low-density lipoprotein receptor gene family: a cellular Swiss army knife? Trends Cell Biol. **12**, 273-280
- OH, S. M., HAHM, D. H., KIM, I. H., CHOI, S.-Y. (2001) Human neutrophil lactoferrin trans-activates the matrix metalloproteinase 1 gene through stress – activated MAPK signalling modules. J. Biol. Chem. **276**, 42575-42579
- OKA, K., TZUNG, K. W., SULLIVAN, M., LINDSAY, E., BALDINI, A., CHAN, L. (1994) Human very-low-density lipoprotein receptor complementary DNA and deduced amino acid sequence and localization of its gene (VLDLR) to chromosome band 9p24 by fluorescence in situ hybridisation. Genomics **20**, 298-300
- ORLANDO, R. A., KERJASCHKI, D., KURIHARA, H., BIEMESDERFER, D., FARQUHAR, M. G. (1992) gp330 associates with a 44-kDa protein in the rat kidney to form the Heymann nephritis antigenic complex. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **89**, 6698-6702
- ORLANDO, R. A., EXNER, M., CZEKAY, R.-P., YAMAZAKI, H., SAITO, A., ULLRICH, R., KERJASCHKI, D., FARQUHAR, M. G. (1997) Identification of a second cluster of ligand – binding repeats in Megalin as a site for receptor – ligand interaction. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **94**, 2368-2373
- PATEL, S. C., ASOTRA, K., PATEL, Y., MCCONATHY, W. J., PATEL, R. C., SURESH, S. (1995) Astrocytes synthesize and secrete the lipophilic ligand carrier apolipoprotein D. NeuroReport **6**, 653-657
- PATEL, R. C., LANGE, D., MCCONATHY, W. J., PATEL, Y. C., PATEL, S. C. (1997) Probing the structure of the ligand binding cavity of lipocalins by fluorescence spectroscopy. Prot. Engl. **10**, 621-625

- PEITSCH, M. C., BOGUSKI, M. S. (1989) Is apolipoprotein D a mammalian bilin-binding protein? *New Biol.* **2**, 197-206
- PENTECOST, B. T., TENG, C. T. (1987) Lactotransferrin is the major estrogen inducible protein of mouse uterine secretions. *J. Biol. Chem.* **262**, 10134-10139
- PERGANDE, M., JUNG, K., PRECHT, S., FELS, L.M., HERBORT, C., STOLTE, H. (1994) Changed excretion of urinary proteins and enzymes by chronic exposure to lead. *Nephrol. Dial. Transplant.* **9**, 613-618
- PEARLMAN, W. H., GUERIGUIAN, J. L., SAWYER, M. E. (1973) A specific progesterone - binding component of human breast cyst fluid. *J. Biol. Chem.* **248**, 5736-5741
- PENCO, S., SCARFI, S., GIOVINE, M., DAMONTE, G., MILLO, E., VILLAGGIO, B., PASSALACQUA, M., POZZOLINI, M., GARRE, C., BENATTI, U. (2001) Identification of an import signal for, and the nuclear localization of, human lactoferrin. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **34**, 151-159
- PROVOST, P. R., WEECH, P. K., TREMBLAY, N. M., MARCEL, Y. L., RASSART, E. (1990) Molecular characterization and differential mRNA tissue distribution of rabbit apolipoprotein D. *J. Lipids Res.* **31**, 2057-2065
- QIN, X., GARIBAY-TUPAS, J., CHUA, P.K., CACHOLA, L., BRYANT-GREENWOOD, G.D. (1997) An autocrine/paracrine role of human decidual relaxin. I. Interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) and tissue plasminogen activator. *Biol. Reprod.* **56**, 800-811
- RASSART, E., BEDIRIAN, A., DO CARMO, S., GUINARD, O., SIROIS, J., TERRISSE, L., MILNE, R. (2000) Apolipoprotein D. *Biochim. Biophys. Acta* **1482**, 185-198
- RAWDANOWICZ, T.J., HAMPTON, A.L., NAGASE, H., WOOLLEY, D.E., SALAMONSEN, L.A. (1994) Matrix metalloproteinase production by cultured human endometrial stromal cells: identification of interstitial collagenase, gelatinase-A, gelatinase-B, and stromelysin-1 and their differential regulation by interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor-alpha. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **79**, 530-536

- REES, D. J., JONES, I. M., HANFORD, P. A., WALTER, S. J., ESNOUF, M. P., SMITH, K. J., BROWNLEE, G. G. (1988) The role of beta-hydroxyaspartate and adjacent carboxylate residues in the first EGF domain of human factor IX. *EMBO J.* **7**, 2053-2061
- RIDDELL, D. R., VINOGRADOV, D. V., STANDARD, A. K., CHADWICK, N., OWEN, J. S. (1999) Identification and characterization of LRP8 (apoER2) in human blood platelets. *J. Lipid Res.* **40**, 1925-1930
- ROESSLER, E., BELLONI, E., GAUDEZ, K., JAY, P., BERTA, P., SCHERER, S. W., TSUI, L. C., MUENKE, M. (1996) Mutations in the human Sonic hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nat. Genet.* **14**, 357-360
- ROHLMANN, A., GOTTHARDT, M., WILLNOW, T. E., HAMMER, R. E., HERZ, J. (1996) Sustained somatic gene inactivation by viral transfer of cre recombinase. *Nat. Biotechnol.* **14**, 1562-1562
- ROHLMANN, A., GOTTHARDT, M., HAMMER, R. E., HERZ, J. (1998) Inducible inactivation of hepatic LRP gene by Cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants. *J. Clin. Invest.* **101**, 689-695
- ROMERO, A., ROMAO, M. J., VARELA, P. F., KOLLN, I., DIAS, J. M., CARVALHO, A. L., SANZ, L., TOPFER-PETERSEN, E., CALVETTE, J. J. (1997) The crystal structures of two spermadhesins reveal the CUB domain fold. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 783-788
- SAFRANSKI, T. J., LAMBERSON, W. R., KEISLER, D. H. (1993) Correlation among three measures of puberty in mice and relationship with estradiol concentration and ovulation. *Biol. Reprod.* **48**, 669-673
- SAHALI, D., MULLIEZ, N., CHATELET, F., DUPIUS, R., RONCO, P., VERROUST, P. (1988) Characterization of a 280 kDa protein restricted to the coated pits of the renal brush border and the epithelial cells of the yolk sac. *J. Exp. Med.* **167**, 213-218
- SAHALI, D., MULLIEZ, N., CHATELET, F., LAURENT-WINTER, C., CITTADELLE, D., SABOURIN, J. C., ROUX, C., RONCO, P., VERROUST, P. (1993) Coexpression in humans in kidney and fetal envelopes of a 280 kD-coated pit-restricted protein. Similarity with the murine target of teratogenic antibodies. *Am. J. Pathol.* **142**, 1654-1667

- SAITO, A., PIETROMONACO, S., LOO, A. K. C., FARQUHAR, M. G. (1994) Complete cloning and sequencing of rat gp330/"megalin", a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 9725 - 9729
- SAKAI, J., HOSHINO, A., TAKAHASHI, S., MIURA, Y., ISHII, H., SUZUKI, H., KAWARABAYASHI, Y., YAMAMOTO, T. (1994) Structure, chromosome location and expression of the human very low density lipoprotein receptor gene. *J. Biol. Chem.* **269**, 2173-2182
- SANCHEZ, L. M., DIEZ-ITZA, I., VIZOSO, F., LOPEZ-OTIN, C. (1992a) Cholesterol and apolipoprotein D in gross cystic disease of the breast. *Clin. Chem.* **38**, 695-698
- SANCHEZ, L. M., VIZOSO, F., DIEZ-ITZA, I., LOPEZ-OTIN, C. (1992b) Identification of the major protein components in breast secretions from women with benign and malignant breast cancer diseases. *Cancer Res.* **52**, 95-100
- SEETHARAM, B., LEVINE, J. S., RAMASAMY, M., ALPERS, D. H. (1988) Purification, properties and immunochemical localization of a receptor for intrinsic factor-cobalamin complex in the rat kidney. *J. Biol. Chem.* **263**, 4443-4449
- SEETHARAM, B., CHRISTENSEN, E. I., MOESTRUP, S. K., HAMMOND, T. G., VERROUST, P. J. (1997) Identification of rat yolk sac target protein of teratogenic antibodies, gp280, as intrinsic factor-cobalamin receptor. *J. Clin. Invest.* **99**, 2317-2322
- SHIRAI, E., IIZUKA, R., (1974) Observation of albumin and blastokinin in the rabbit uterine fluid before implantation (author's translation). *Nippon Funin. Gakkai. Zasshi.* **19**, 52-54
- SIMARD, J., VEILLEUX, R., DE LAUNOIT, Y., HAAGENSEN, D. E., LABRIE, F. (1991) Stimulation of apolipoprotein D secretion by steroids coincides with inhibition of cell proliferation in human LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res.* **51**, 4336-4341
- SINGH, G., KATYAL, S. L., WONG-CHONG, M. L. (1986) A quantitative assay for Clara cell-specific protein and its application in the study of development for pulmonary airways in the rat. *Pediatr. Res.* **20**, 802-805

- SORIANO, P., MONTGOMERY, C., GESKE, R., AND BRADLEY, A. (1991) Targeted Disruption of the c-src Proto-Oncogene Leads to Osteoporosis in Mice. *Cell* **64**, 693-702.
- SOUSA, M. M., NORDEN, A. G., JACOBSEN, C., WILLNOW, T. E., CHRISTENSEN, E. I., THAKKER, R. V., VERROUST, P. J., MOESTRUP, S. K., SARAIVA, M. J. (2000) Evidence for the role of Megalin in the renal uptake of transthyretin. *J. Biol. Chem.* **275**, 38176-38181
- SOUTAR, A. K. (1992) Familial hypercholesterolemia and LDL receptor mutations. *J. Intern. Med.* **231**, 633-641
- SPREYER, P., SCHAAL, H., KUHN, G., ROTHE, T., UNTERBECK, A., OLECK, K., MULLER, H. W. (1990) Regeneration - associated high levels expression of apolipoprotein D mRNA in endoneurial fibroblasts of peripheral nerve. *EMBO J.* **9**, 2479-2484
- SPRINGER, T. A. (1998) An extracellular β -propeller module predicted in lipoprotein and scavenger receptors, tyrosine kinases, epidermal growth factor precursor and extracellular matrix components. *J. Mol. Biol.* **283**, 837-862
- STOCKINGER, W., BRANDES, C., FASCHING, D., HERMANN, M., GOTTHARDT, M., HERZ, J., SCHNEIDER, W. J., NIMPF, J. (2000) The reelin receptor apoER2 recruits JNK-interacting proteins -1 and -2. *J. Biol. Chem.* **275**, 25625-25632
- STRIPP, B. R., HUFFMANN, J. A., BOHINSKI, R. J. (1994) Structure and regulation of the murine Clara cell secretory protein gene. *Genomics* **20**, 27-35
- STRIPP, B. R., LUND, J., MANGO, G. W., DOYEN, K. C., JOHNSTON, C., HULTENBY, K., NORD, M., WHITSETT, J. A. (1996) Clara cell secretory protein: a determinant of PCB accumulation in mammals. *Am. J. Physiol.* **271**, L656-L664
- SÜDHOF, T. C., GOLDSTEIN, J. L., BROWN, M. S., RUSSELL, D. W. (1985a) The LDL receptor gene: A mosaic of exons shared with different proteins. *Science* **228**, 815-822

- SÜDHOF, T. C., RUSSELL, D. W., GOLDSTEIN, J. L., BROWN, M. S., SANCHEZ-PESCADOR, R., BELL, G. I. (1985b) Cassette of eight exons shared by genes for LDL receptor and EGF precursor. *Science* **228**, 893-895
- SURESH, S., YAN, Z., PATEL, R. C., PATEL, Y. C., PATEL, S. C. (1998) Cellular cholesterol storage in the Niemann-Pick disease type C mouse is associated with increased expression and defective processing of apolipoprotein D. *J. Neurochem.* **70**, 242-251
- TAKAHASHI, S., KAWARABAYASI, Y., NAKAI, T., SAKAI, J., YAMAMOTO, T. (1992) Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 9252-9256
- TERRISSE, L., POIRIER, J., BERTRAND, P., MERCHED, A., SIEST, G., MILNE, R.W., RASSART, E. (1998) increased levels of apolipoprotein D in cerebrospinal fluid and hippocampus of Alzheimer's patients. *J. Neurochem.* **71**, 1643-1650
- TOWBIN, H., STAEBELIN, T., GORDON, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **76**, 4350-4354.
- TROMMSDORFF, M., GOTTHARDT, M., HIESBERGER, T., SHELTON, J., STOCKINGER, W., NIMPF, J., HAMMER, R. E., RICHARDSON, J. A., HERZ, J. (1999) Reeler / Disabled – like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and Apo E receptor 2. *Cell* **97**, 689-701
- UMLAND, T. C., SWAMINTHAN, S., FUREY, W., SINGH, G., PLETCHER, J., SAX, M. (1992) Refined structure of rat clara cell 17 kDa protein at 3,0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **224**, 441-448
- URZUA, M. A., STAMBAUGH, R., FLICKINGER, G., MASTROIANNI, L. (1970) Uterine and oviduct fluid protein patterns in the rabbit before and after ovulation. *Fertil. Steril.* **21**, 860-865
- VAN DE WESTHUYZEN, D. R., STEIN, M. L., HENDERSON, H. E., MARAIS, A. D., FOURIE, A. M., COETZEE, G. A. (1991) Deletion of

- two growth-factor repeats from the low density lipoprotein receptor accelerates its degradation. *Biochem. J.* **277**, 677-682
- VAN LEUVEN, F., STAS, L., HILLIKER, C., LORENT, K., UMANS, L., SERNEELS, L., OVERBERGH, L., TORREKENS, S., MOECHARS, D., DE STROOPER, B. (1994) Structure of the gene (LRP1) coding for the human α 2-macroglobulin receptor lipoprotein receptor - related protein. *Genomics* **24**, 78 – 89
- VON EULER, U. S. (1988) in: Curtis, P. B. (Ed.) Prostaglandins, biology and chemistry of prostaglandins and related eicosanoids. Churchill-Livingstone, 1-7
- WEBB, J. C., PATEL, D. D., JONES, M. D., KNIGHT, B. L., SOUTAR, A. K. (1994) Characterization and tissue-specific expression of the human “very low density lipoprotein (VLDL) receptor” mRNA. *Hum. Mol. Genet.* **3**, 531-537
- WEBB, D. J., NGUYEN, D. H., SANKOVIC, M., GONIAS, S. L. (1999) The very low density lipoprotein receptor regulates urokinase receptor catabolism and breast cancer cell motility in vitro. *J. Biol. Chem.* **274**, 7412-7420
- WEBB, D. J., THOMAS, K. S., GONIAS, S. L. (2001) Plasminogen activator inhibitor 1 functions as a urokinase response modifier at the level of cell signaling and thereby promotes MCF-7 cell growth. *J Cell Biol.* **152**, 741-752.
- WILLNOW, T. E., GOLDSTEIN, J. L., ORTH, K., BROWN, M. S., HERZ, J. (1992) Low density lipoprotein receptor-related protein and gp330 bind similar ligands, including plasminogen activator-inhibitor complexes and lactoferrin, an inhibitor of chylomicron remnant clearance. *J. Biol. Chem.* **267**, 26172-26180
- WILLNOW, T. E., ARMSTRONG, S. A., HAMMER, R. E., HERZ, J. (1995a) Functional expression of low density lipoprotein receptor-related protein is controlled by receptor-associated protein in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4537-4541
- WILLNOW, T. E., HILPERT, J., ARMSTRONG, S. A., ROHLMANN, A., HAMMER, R. E., BURNS, D. K., HERZ, J. (1996) Defective forebrain

- development in mice lacking gp330/megalin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 8460-8464
- WILLNOW, T. E., MOEHRING, J. M., INOCENCIO, N. M., MOEHRING, T. J., HERZ, J. (1996b) The low-density-lipoprotein receptor-related protein (LRP) is processed by furin in vivo and in vitro. *Biochem. J.* **313**, 71-76
- WILLNOW, T. E., ROHLMANN, A., HORTON, J., OTANI, H., BRAUN, J. R., HAMMER, R. E., HERZ, J. (1996c) RAP, a specialized chaperone, prevents ligand-induced ER retention and degradation of LDL- receptor-related endocytic receptors. *EMBO J.* **15**, 2632-2639
- WILLNOW, T. E. (1998) Receptor associated protein (RAP): A specialized chaperone for endocytic receptors. *Biol. Chem.* **379**, 1025-1031
- WILLNOW, T. E. (1999) The low-density lipoprotein receptor gene family: multiple roles in lipid metabolism. *J. Mol. Med.* **77**, 306-315
- WUNSCH, W., TENNISWOOD, M. P., SCHNEIDER, M. R., VOLLMER, G. (1998) Estrogenic regulation of clusterin mRNA in normal and malignant endometrial tissue. In: *J. Cancer* **76**, 684-688
- XU, D., KOZYRAKI, R., NEWMAN, T. C., FYFE, J. C., (1999) Genetic evidence of an accessory activity required specifically for cubilin brush-border expression and intrinsic factor-cobalamin absorption. *Blood* **94**, 3604-3606
- YANG, C. Y., GU, Z. W., BLANCO-VACA, F., GASKELL, S. J., YANG, M., MASSEY, J., GOTTO, A. M., POWNALL, H. J. (1994) Structure of human apolipoprotein D: locations of the intermolecular and intramolecular disulfide links. *Biochemistry* **33**, 12451-12455
- YU, L.-C., CHEN, Y.H. (1993) The developmental profile of lactoferrin. *Biochem. J.* **296**, 107-111
- ZHENG, G., BACHINSKY, D. R., STAMENKOVIC, I., STRICKLAND, D. K., BROWN, D. (1994) Organ distribution in rats of two members of the low-density lipoprotein gene family, gp330 and LRP/ α 2MR, the receptor-associated protein (RAP). *J. Histochem. Cytochem.* **42**, 531 – 542
- ZIMECKI, M., MAZURIER, J., SPIK, G., KAPP, J. A. (1995) Human lactoferrin induces phenotypic and functional changes in murine splenic B cells. *Immunology* **86**, 122-127

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN:

geboren am 11.11.1971 in Pinneberg

AUSBILDUNGSDATEN

1978 – 1991 Grundschule und Gymnasium in Pinneberg

1991 – 1997 Biologiestudium

Universität der Freien und Hansestadt Hamburg

Studienschwerpunkte: Molekularbiologie, Mikrobiologie und
Zoologie, Diplom in Biologie, Gesamtnote: sehr gut

1997 – 1998 Promotionsstudium

Universität der Freien und Hansestadt Hamburg

1999 – 2002 Promotionsstudium Humboldt-Universität Berlin

Die Arbeit wurde am Max-Delbrück-Centrum
für Molekulare Medizin (MDC) in Berlin-Buch erstellt
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Thomas Willnow,
Molekulare Herz-Kreislauf-Forschung
Thema der Arbeit:

Untersuchungen zur Rolle des Endozytoserezeptors Megalin in der
zellulären Aufnahme von Steroidcarrierproteinen

PUBLIKATIONEN

Burmeister, R., Bøe, I.-M., Nykjaer, A., Jacobsen, C., Moestrup, S.K.,
Verrust, P., Christensen, E.I., Lund, J. und Willnow, T.E. (2001) A Two-
receptor Pathway for Catabolism of Clara Cell Secretory Protein in the
Kidney. *J. Biol. Chem.* **276**, 13295-13301

Hilpert, J., Vorum, H., Burmeister, R., Spoelgen, R., Grishkovskaya, I.,
Misselwitz, R., Nykjaer, A. und Willnow, T.E. (2001) Efficient Eukaryotic
Expression System for Authentic Human Sex Hormone – Binding
Globulin. *Biochem. J.* **360**, 609 – 615

Berlin, 08.10.2002

